

Departement für Pferde der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst, Dipl. ECVS

---

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)

Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

***Vergleichende Untersuchung verschiedener Metallimplantate  
auf ihre Osseointegration und Biokompatibilität  
– eine Studie am Schaf***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Vetsuisse-Fakultät

Universität Zürich

vorgelegt von

Christine Sievert

Tierärztin

aus Köln, Deutschland

Genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin

Prof. Dr. med. Ulrich Stöckle, Korreferent

Zürich 2011



Meinen Eltern Hartmut und Cornelia Sievert  
In Liebe und Dankbarkeit



Zusammenfassung .....	1
Summary.....	2
1 Literaturübersicht.....	3
1.1 Osseointegration .....	3
1.1.1 Abläufe der Osseointegration .....	4
1.2 Implantate .....	5
1.2.1 Implantatoberfläche .....	6
1.3 Metallische Implantatwerkstoffe .....	6
1.3.1 Stahl .....	7
1.3.2 Cobalt-Chrom und seine Legierungen .....	9
1.3.3 Titan und seine Legierungen.....	10
1.3.4 Zirkonium .....	12
1.4 Ziel der Studie.....	13
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Aufbau der Studie .....	14
2.2 Implantate .....	15
2.2.1 Implantatherstellung und –oberflächen .....	15
2.3 Tierversuch .....	16
2.4 Schafmanagement.....	16
2.5 Präoperative Vorsorge .....	17
2.6 Operation .....	17
2.6.1 Operationsvorbereitung .....	17
2.6.2 Chirurgischer Eingriff.....	18
2.7 Postoperatives Management .....	19
2.8 Fluoreszenzmarkierung.....	20
2.9 Probengewinnung und –aufbereitung .....	20
2.10 Auswertung.....	23
2.10.1 Removal-Torque-Test.....	23
2.10.2 Fluoreszenz .....	23
2.10.3 Histomorphometrie .....	23
2.10.4 BIC (Bone to implant contact).....	24

2.10.5 Statistik.....	24
<hr/>	
3 Resultate .....	25
3.1 Operation und postoperative Phase .....	25
3.2 Makroskopische und Radiologische Auswertung .....	25
3.3 Auswertung des Removal-Torque-Tests .....	25
3.4 Histologische Auswertung .....	27
3.4.1 Qualitative Beurteilung der histologischen Schnitte .....	27
3.4.2 Auswertung der Fluoreszenzschnitte .....	28
3.4.3 Histomorphometrische Auswertung der Toluidinblau-Dickschnitte .....	28
3.4.4 Auswertung des BIC .....	30
3.5 Zusammenfassung der Resultate .....	31
<hr/>	
4 Diskussion .....	32
4.1 Das Schaf als Modell.....	33
4.2 Operationsmethode.....	35
4.3 Probengewinnung und –aufbereitung.....	36
4.4 Removal-Torque-Test .....	36
4.5 Fluoreszenz.....	39
4.6 Histomorphometrie.....	40
4.7 BIC .....	40
4.8 Biokompatibilität.....	42
4.9 Schlussfolgerung und Perspektiven .....	42
<hr/>	
5 Literaturverzeichnis.....	44
<hr/>	
6 Abkürzungsverzeichnis .....	49
<hr/>	
7 Anhang .....	50
7.1 Tabellen.....	50
7.2 Abbildungen .....	53
<hr/>	
Danksagung.....	
<hr/>	
Lebenslauf .....	
<hr/>	

## Zusammenfassung

In der Studie wurden 4 metallische Implantatwerkstoffe untersucht. Die Materialkonfigurationen waren: Cobalt-Chrom(CC), CC/Titanbeschichtung(CCTC), CC/Zirkonium/Titanbeschichtung (CCZTC), Reintitan (PTST), Stahl, TAN Standard (TANST), TAN new finish (TANNEW). Es wurden 7 Schafe operiert, insgesamt 126 Implantate. Nach 8 Wochen wurden die Proben makroskopisch, radiologisch, biomechanisch, histomorphometrisch und histologisch untersucht. CC-Schrauben wiesen einen signifikant geringeren Ausdrehwert als PTST-Schrauben auf. Zu den übrigen Schraubentypen liess sich eine Tendenz geringerer Werte festmachen. Stahl zeigte keine signifikanten Unterschiede gegenüber CC und TANST, jedoch tendenziell geringere Werte als die verbleibenden Werkstoffe. Die Befunde der Fluoreszenzauswertung deckten sich mit denen des Torque-Tests. Histomorphometrisch lagen zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede vor. Der BIC (Bone-to-implant-contact) zeigte einen signifikant geringeren Kontaktlinienanteil von CC gegenüber Stahl. Stahl wies einen geringeren Anteil im Vergleich zu den anderen Materialkonfigurationen auf.

Die Studie konnte beweisen, dass CC und Stahl eine geringere Osseointegration zeigen als die übrigen Werkstoffe. Beschichtung von CC kann die Osseointegration erhöhen. Titanlegierungen unterscheiden sich in ihrem Osseointegrationsverhalten nicht von PTST.

### Summary

In the study 4 different metallic implant materials partly coated or polished were tested for their osseointegration and biocompatibility. Materials were: Cobalt-Chrome (CC), CC/ Titanium coating (CCTC), CC/ Zirconium/ Titanium coating (CCZTC), Pure Titanium Standard (PTST), Steel, TAN Standard (TANST) and TAN new finish (TANNEW). Surgery was performed on 7 sheep, a total of 126 implants. After 8 weeks the specimens were evaluated macroscopically, radiologically, biomechanically, histomorphometrical and histologically. CC screws showed significantly lower Torque removal values than PTST screws and also a tendency towards lower values compared to the other materials, except for Steel. Steel screws had no significant differences in comparison to CC and TANST, however also a trend towards lower values than the remaining materials. The results of the fluorescence sections overlapped with those of the Torque-Removal-Test. Histomorphometrical there were no significant differences between the groups. The BIC (Bone-to-implant-contact) exposed a significantly lower contact line of CC compared to Steel. Steel again, showed a lower ratio compared to the other materials.

This study proved, that CC and Steel show lower osseointegration than the other materials. Coating CC increases osseointegration. Titanium-alloys do not vary from PTST in their osseointegrative behaviour.



# 1 Literaturübersicht

## 1.1 Osseointegration

Der Begriff der Osseointegration wurde in den 60ern von Brånemark und seinen Mitarbeitern für die Zahnmedizin entwickelt und beschreibt die direkte Verankerung und Integration eines Implantates im lebenden Knochen<sup>1</sup>. Während die Bezeichnung der Osseointegration ursprünglich Bezug auf Zahnimplantate nahm, wird sie heute auch auf orthopädische Implantate und deren Verbindung zum Knochen angewendet<sup>2</sup>. Es handelt sich bei der Osseointegration um einen komplexen Vorgang, der von zahlreichen Faktoren abhängt. Implantat bezogene Faktoren wie Material, Form, Oberfläche haben ebenso Einfluss auf die Prozedur, wie die mechanische Belastung, die Operationsmethode, anatomische Lokalisation als auch individuelle Unterschiede bezüglich der Knochenqualität des Patienten. Angestrebt wird eine Interface-Matrix, die in ihrer Struktur, Zusammensetzung und biomechanischen Eigenschaft der des Knochens nahezu entspricht um möglichst früh einer Belastung stand zu halten<sup>3</sup>.

Charakterisiert wird die Integration in den Knochen durch eine Folge von biologischen Reaktionen. Der durch den chirurgischen Eingriff in Mitleidenschaft gezogene, nekrotische Gewebereich wird abgebaut, anschliessend wird neue Matrix hergestellt um die entstandene Lücke zu füllen<sup>4</sup>. Im Wesentlichen laufen 3 aufeinanderfolgende Phasen ab: zunächst resorbieren Osteoklasten das alte Knochengewebe, dann erfolgt die Umkehr, d.h. mononukleäre Zellen erscheinen im betroffenen Gewebe. Die abschliessende Phase ist die, in der alter Knochen durch neuen ersetzt wird, nachdem Osteoblasten neue Knochenmatrix sezerniert haben<sup>5</sup>.

Knochenheilung kann primär (direkt) oder sekundär (indirekt) erfolgen. Für eine primäre Knochenheilung eines Traumas ist ein direkter Kontakt der Fraktarenden notwendig. Geflechtknochen wird direkt gebildet, ohne vorherige Zwischenstufen anderer Gewebe. Im Gegensatz dazu, wird bei sekundärer Knochenheilung im Frakturspalt zunächst Bindegewebe bzw. Knorpelgewebe gebildet. Im Zuge der fortschreitenden Heilung differenziert dieses Gewebe sich dann zum Knochengewebe. Bei der Osseointegration handelt es sich um eine primäre Knochenheilung. Statt einem Knochen-Knochen-Kontakt, wie es bei Kontakt der Fraktarenden gegeben wäre, liegt hierbei jedoch ein Knochen-Implantat-Kontakt vor<sup>6</sup>. Voraussetzungen für die Integration des Implantats in den Knochen sind eine gewisse Primärstabilität sowie die einer Mindestdistanz zwischen Implantatoberfläche und Knochen<sup>7</sup>.

### 1.1.1 Abläufe der Osseointegration

Die Abläufe der Osseointegration ähneln denen der Frakturheilung. Das Bohrloch kann als gewöhnliche Knochenwunde betrachtet werden. Durch die entstandene Hitze beim Bohren reichen die Verletzungen auch noch bis zu 500 µm in das umliegende, bereits vorhandene Knochengewebe hinein<sup>8,9</sup>. Aufgrund der Traumatisierung während der chirurgischen Implantatsetzung entstehen im Spalt zwischen Implantat und Knochen Blutkoagula. Der Heilungsprozess wird durch freigesetzte, nichtkollagene Proteine, Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert<sup>6</sup>. Die Freisetzung dieser Mediatoren erfolgt zuerst durch aktivierte Blutzellen<sup>9</sup>. Osteoklasten resorbieren das, durch die unterbrochene Blutzufuhr, nekrotisch gewordene Knochengewebe und bilden neue Haver'sche Systeme aus<sup>10</sup>. Über die Blutgefäße in den Haver'schen Systemen können chemotaktisch rekrutierte, multipotente, mesenchymale Stammzellen an den Ort der Läsion gelangen<sup>6</sup>. Ebenfalls dient die Ausbildung einer Fibrinmatrix der Migration von osteogenetischen Zellen<sup>9</sup>. Diese wandern entlang des Fibringerüstes zur Implantatoberfläche. Der Vorgang wird als Ostekonduktion definiert.

In der frühen Phase ist auf der Implantatoberfläche eine schmale, afibrilläre Schicht vorhanden. Diese wird von den osteogenetischen Zellen produziert und ist unabhängig vom implantierten Material<sup>3,8</sup>. Die Zellen proliferieren und differenzieren sich zu Osteblastenvorläufern und danach zu Osteoblasten und lagern bereits einige Tage nach der Implantation eine kollagene Matrix auf der afibrillären Schicht ab. Es folgt innerhalb der ersten 4-6 Wochen post OP die Formation von Geflechtknochen um den mechanischen Zusammenhang wieder herzustellen. Geflechtknochen besteht aus relativ losen, ungeordneten kollagenen Fasern und zahlreichen Osteozyten. Nach und nach wird dieser Knochen umgebaut und durch lamellären Knochen ersetzt. Parallele, geordnet verlaufende Fasern charakterisieren den lamellären Knochen. Die Reichweite des neu gebildeten Knochens beträgt bis zu 1 mm vom Implantat ausgehend<sup>9,11</sup>.

Je nach Ausrichtung unterscheidet man Distanz- (vom Knochen zum Implantat hin) bzw. Kontaktosteogenese (vom Implantat zum Knochen). Da die Implantatoberfläche vorher keinen Knochenkontakt hatte, wird dieser Prozess auch als „*de novo bone formation*“ bezeichnet<sup>12</sup>.

## 1.2 Implantate

Weltweit sind Millionen von Menschen von entzündlichen und degenerativen Knochen- und Gelenkserkrankungen betroffen. Frakturen, Rückenprobleme, Osteoporose, Skoliose und andere muskuloskelettale Probleme erfordern den Einsatz von temporären oder permanenten chirurgischen Implantaten um physiologische Funktionen zu unterstützen und wieder herzustellen. Im Jahre 2004 wurde der steigende Marktanteil an Implantatmaterialien auf dem Markt auf 12-20% pro Jahr geschätzt. Dies hängt auch mit dem zunehmenden Anteil älterer Personen in der Bevölkerung zusammen<sup>13</sup>. Durch eine stetige Verbesserung der klinischen Versorgung steigt auch der Einsatz von Implantaten. Somit nehmen Implantate, neben ihrer klinisch bedeutsamen Rolle, auch im wirtschaftlichen Sektor einen hohen Rang ein<sup>14</sup>.

Verschiedenste Kriterien sind bei der Auswahl des Werkstoffes für das Implantat zu beachten: darunter fallen der Ort der Implantatplatzierung, die Dauer, die angestrebte Funktion sowie das biologische Milieu, welches das Implantat im Körper umgeben wird<sup>15</sup>.

Biomaterialien, die in der Orthopädie Anwendung finden können in 3 Gruppen eingeteilt werden:

- 1.. Bioinerte Materialien (1. Generation)
- 2.. Bioaktive und abbaubare Materialien (2. Generation)
- 3.. Materialien, die spezifische Antworten auf molekularer Ebene hervorrufen (3. Generation)

Dabei ist es keineswegs so, dass die neuen Generationen, die alten ersetzen, sondern jede Generation ist für entsprechende Indikationen in der Entwicklung und im Einsatz. Gerade für Erkrankungen der Wirbelsäule, Frakturbehandlungen, etc. sind Metalle und Metallegierungen, aus der Gruppe der bioinerten Materialien, weiterhin als Lasttragende Einheiten unabdingbar<sup>16</sup>.

Abhängig von der Nutzungsdauer der Implantate unterscheidet man zwischen temporärer und permanenter Nutzung. Bei einer temporären Nutzung, die vor allem in der Traumatologie Anwendung findet, werden die Implantate nach erfolgter Heilung wieder aus dem Organismus entfernt. Hierfür ist es wichtig, dass keine allzu intensive Osseointegration erfolgt, da diese wiederum Probleme bei der Entfernung der Implantate bereiten könnte. Permanente Implantate hingegen, wie sie z.B. in der

Wirbelsäulenchirurgie eingesetzt werden, sollen möglichst gut osseointegriert sein, um Risiken eines Implantatversagens zu minimieren.

Die vorliegende Studie befasst sich ausschliesslich mit Untersuchungen der erstgenannten Gruppe, den bioinerten Metallen.

### 1.2.1 Implantatoberfläche

Die Mikrotextur der Oberfläche spielt eine wesentliche Rolle für den Verlauf der Osseointegration. So wirkt sich die Optimierung der Oberfläche, in Form einer gewissen Rauigkeit, fördernd auf die Osseointegration aus. Ausschlaggebend für die Rauigkeit eines Präparates sind die Form und die Dimension der Unebenheiten auf der Implantatoberfläche<sup>6</sup>. Die meisten kommerziellen Präparate besitzen eine moderate Rauigkeit ( $S_a > 1-2 \mu\text{m}$ ), welche abhängig von den Herstellungsverfahren der jeweiligen Firmen ist<sup>17</sup>. Die Anheftung von Fibrin erfolgt schneller an einer rauen, komplexen Oberfläche und fördert so den Migrationsprozess der Osteoblasten zum Implantat<sup>12</sup>. Proliferation und Differenzierung der Zellen schliesst sich an<sup>18</sup>. Eine raue Oberfläche gewährleistet gleichzeitig eine Vergrösserung der Oberfläche und unterstützt somit die initiale Primärstabilität.

Eine Einteilung der Implantatoberflächen kann anhand ihrer maschinellen Bearbeitungstechniken vorgenommen werden. Zudem unterscheidet man aufgeraute, beschichtete Implantate von unbeschichteten. Zu den letzteren zählen Implantate deren Oberfläche durch Sandstrahlung, Säureätzung oder anodisch aufgeraut wurde<sup>9</sup>.

### 1.3 Metallische Implantatwerkstoffe

Metallische Implantatwerkstoffe waren die ersten Werkstoffe die als Implantatgrundlage eingesetzt wurden<sup>13</sup>. Erste Anwendungen können auf das 16. Jahrhundert rückdatiert werden wobei die Einführung der aseptischen Chirurgie im 19. Jahrhundert einen weiteren Vorschub erbrachte durch die Reduktion von Operations-Assoziierten Infektionen, die Implantatversagen bedingen<sup>19</sup>. Rostfreier Stahl, Cobalt-Chrom/-legierungen und Titan/-legierungen sind heute die Metalle, die in Medizinprodukten die häufigste Anwendung finden.

In den Anfängen waren die Anforderungen an die Implantate noch gering. Es wurde einzig darauf Wert gelegt, dass die physikalischen Eigenschaften des Materials denen des ersetzten Gewebes entsprachen und gleichzeitig sollte die Anforderung erfüllt sein, die Immunantwort auf ein Minimum zu reduzieren. Die Materialien sollten also ‚inert‘

sein. Heutzutage gibt es, neben der Verarbeitbarkeit und der Zugänglichkeit, mechanische, physikalische, chemische und biologische Kriterien, die miteinbezogen werden in die Auswahl des Materials. Da die mechanischen und physikalischen Anforderungen recht gut zu erfüllen sind, liegt der besondere Schwerpunkt auf der Biokompatibilität des Materials<sup>19</sup>. Diese ist natürlich abhängig vom ausgewählten Werkstoff, wird aber auch beeinflusst durch den Herstellungsprozess und klinische Nachbehandlungen, wie z.B. Sterilisationen<sup>20</sup>. Biokompatibilität beinhaltet zum einen die biologische Funktionalität, zum anderen die biologische Verträglichkeit des Implantates. Grundlage für die Verträglichkeit ist ein chemisch stabiles Material, das eine Korrosionsbeständigkeit gewährleistet. In sauerstoffhaltiger Umgebung bildet sich bei Metallen eine Oxidschicht, die vor Korrosion schützt, indem sie als eine Art Barriere den direkten Kontakt zwischen Metall und umgebendem Milieu verhindert und so Wechselwirkungen vorbeugt<sup>21</sup>. Beeinflusst wird diese Passivschicht allerdings, wenn es durch andauernde Abrasion zur Entstehung von Abriebpartikeln kommt, die sich ablagern, als Fremdkörper wirken und so die Freisetzung neuer Metallionen beschleunigen<sup>22</sup>. Nicht immer auszuschliessen ist Reibkorrosion (fretting), die bei Relativbewegungen zwischen Osteosyntheseplatten und Schraubenköpfen entsteht<sup>20</sup>. Für permanente Implantate sollten daher Materialien verwendet werden, die fähig sind, die Passivschicht wieder aufzubauen<sup>23</sup>.

Funktionelle Anforderungen an das Implantat sind vor allem die Stabilisierung sowie eine gute Fixation. Der Elastizitätsmodul des gewählten Metalls sollte dem des Knochens ähnlich sein<sup>24</sup>. Durch ihre mechanischen Eigenschaften eignen sich Metalle besonders für den Ersatz von Hartgewebe und werden daher oft als künstliche Hüftgelenke, Osteosyntheseplatten und -schrauben oder Dentalimplantate eingesetzt<sup>25</sup>. Metalle sind Mittel der Wahl, wenn lasttragenden Funktionen erwünscht sind. Aufgrund ihrer überragenden Bruch- und Ermüdungsbeständigkeit entsprechen sie der hohen mechanischen Anforderung für Lasteinleitung und Lastübertragung<sup>19,20</sup>.

### **1.3.1 Stahl**

Stahl war eines der ersten Metalle, das erfolgreich für die Orthopädie verwendet wurde. Auch heutzutage wird Stahl noch in grossem Umfang für die Traumatologie in Form von Platten, Schrauben und Nägeln genutzt, insbesondere bei hoher mechanischer Belastung. Dies ist mitunter der mechanischen Stärke, den niedrigen Kosten, der einfachen Zugänglichkeit und der unkomplizierten Herstellung zuzuschreiben<sup>16</sup>. Bei dem meistverwendeten Stahl handelt es sich um rostfreien Stahl mit der Bezeichnung

316L. Dieser setzt sich zusammen aus Stahl mit 17-20% Chrom, 12-14% Nickel und 2-4% Molybdän<sup>20</sup>. Dabei dient Chrom der Ausbildung der schützenden Passivschicht. Zusätzlich verbessert auch Nickel die Korrosionseigenschaft und stabilisiert die nicht-magnetische Mikrostruktur.. Vor örtlichen Korrosionen wie Lochfrass und Spaltkorrosion schützt das Legierungselement Molybdän. Eine Mindestgehaltsforderung für Chrom und Molybdän ist aus diesem Grund in der Norm festgelegt worden. Dennoch kann es durch (übermässigen) Verschleiss zur Beschädigung der Passivschicht kommen und Korrosionsprodukte können im Gewebe und auf dem Implantat als braune oder graue Verfärbungen sichtbar werden. Dies tritt vor allem an Orten mit möglichen Minimalbewegungen, wie z.B. zwischen Plattenloch und Schraubenkopf, auf. Die biologische Verträglichkeit von Chrom und Nickel ist als reduziert zu bewerten. Allerdings verhindert die Korrosionsbeständigkeit von Stahl die Freisetzung einer grösseren Menge, die für die Auslösung einer Gewebereaktion von Nöten wäre. Nickel ist jedoch in Hinsicht auf seine potentielle Allergen-Wirkung (Nickelhaltiger Modeschmuck) gesondert zu betrachten. Der Trend geht daher zur Entwicklung von Nickelfreiem Stahl. Dieser besitzt eine noch bessere Festigkeit, Bruchdehnung und Korrosionsbeständigkeit<sup>26</sup>.

Die Verbesserung der mechanischen Eigenschaften führt jedoch dazu, dass die Bearbeitung des Materials aufwendiger wird<sup>21</sup>. Eine gute Kombination von Festigkeit und Duktilität (plastischer Verformbarkeit) verleihen rostfreiem Stahl gute mechanische Eigenschaften. Die spezielle Duktilität ermöglicht es, das Material je nach Anforderung zu bearbeiten. Vorteilhaft ist auch das günstige Bruchverhalten. Eine bleibende Verformung kann durch den Chirurgen gut gespürt werden und somit kann Implantatversagen vorgebeugt werden<sup>21</sup>. Zudem ist der Rohmaterialpreis niedriger, als für andere Metalle. Nachteilig haftet Stahl seine im Vergleich zu Titan und dessen Legierungen geringere Dauerfestigkeit an. Diese hat Einfluss auf die Ermüdungsbruchfestigkeit unter zyklischer Last. Aus diesem Grund sollte sich der Einsatz auf temporäre Implantate beschränken<sup>27</sup>. Die maximale Nutzungsdauer sollte 12 Monate nicht überschreiten. Rostfreier Stahl ist nicht-magnetisch und Patienten mit Implantaten können somit an Magnet-Resonanz-Tomographien teilnehmen. Es kann jedoch zu Störartefakten kommen, welche die Qualität des MRT's beeinflussen<sup>28</sup> (Hauptaugenmerk liegt auf der MRT-abhängigen Erhitzung der Implantate. Diese wiederum ist abhängig von den MRT Bedingungen wie z.B. Stärke des magnetischen Feldes, dem exponierten Körperteil etc.. Zur Sicherheit des Patienten sollte das

Verhalten von Implantaten im MRT individuell entsprechend dem Implantat und dem Hersteller, gemessen an den gegebenen Konditionen beurteilt werden.) Zudem besitzt Stahl im Vergleich zu den anderen Metallen die geringste Korrosionsbeständigkeit<sup>19</sup>. Auch die biologische Verträglichkeit ist geringer als die von Titanimplantaten, wobei sie jedoch für temporäre Implantate vollkommen ausreicht<sup>21</sup>.

### **1.3.2 Cobalt-Chrom und seine Legierungen**

Die erste medizinische Anwendung von Cobalt-Chrom kann auf das Jahr 1929 rückdatiert werden. Cobalt-Chrom sollte Stahl auf dem Markt bald als Werkstoff für permanente Implantate ersetzen. Später wurde es durch Titan abgelöst. Die beiden Haupteinsatzgebiete von Cobalt-Chrom sind heute die Orthopädie und die kardiovaskuläre Chirurgie<sup>20</sup>. Die meist angewandte Form ist aktuell eine CoCrMo-Legierung. Es wird zwischen gegossenen und geschmiedeten Legierungen unterschieden, wobei letztere eine homogenere, feinkörnigere Struktur haben und dadurch bessere mechanische Eigenschaften besitzen<sup>29</sup>. Moderne Heissbearbeitungstechniken ermöglichen heutzutage eine noch feinere und homogenere Körnung bei geschmiedeten Legierungen zu erzielen<sup>23</sup>. Aufgrund ihrer höheren Festigkeit werden geschmiedete Legierungen den gegossenen als Implantate vorgezogen<sup>13</sup>. Eine Sonderstellung nimmt Cobalt-Chrom durch seine herausragende Verschleissbeständigkeit und seine hohe Abriebfestigkeit ein. Dies ist vor allem für den Gelenkersatz essentiell. Cobalt-Chrom wird daher bevorzugt bei Metall auf Metall-Hüftprothesen angewendet<sup>30</sup>. Des Weiteren zählt eine hohe Ermüdungsfestigkeit zu den Vorzügen des Materials. Die Härte, die durch Chrom als Karbidbildner entsteht, erschwert jedoch auch die mechanische Bearbeitung und limitiert so den Einsatz des Werkstoffs. Die Korrosionsbeständigkeit schneidet im Vergleich zu Stahl besser ab, eine Korrosionsschädigung ist daher auch äusserst selten und kommt nur unter besonderen Umständen zustande<sup>19</sup>. Kombinationen von Stahl und Cobalt-Chrom sollten vermieden werden, aufgrund der Korrosionsanfälligkeit von Stahl und der möglichen Interaktion zwischen den Metallen. Bei Kombination verschiedener CoCr-Legierungen konnte keine Korrosion beobachtet werden<sup>31</sup>. Nichts desto trotz kann es zur Freisetzung von Metallionen kommen<sup>27,32</sup>. In einer *in vitro* Studie mit humanen Zelllinien konnte Cobalt-Chrom jedoch keine Zytotoxizität nachgewiesen werden<sup>33</sup>. Als Mangel bleibt, wie auch bei Stahl, der hohe Elastizitätsmodul von 220-230 GPa zu erwähnen. Durch die Lastübertragung auf das Implantat bleiben mechanische Reize für den Knochen aus, Dieser Vorgang wird als *stress-shielding* definiert. Dadurch ausgelöste

Knochenresorption kann so zum Implantatversagen führen<sup>16,34</sup>. Die Langzeiteffekte von Cobalt-Chrom Implantaten sind noch ungeklärt und müssen weiterhin untersucht und beobachtet werden. Daher ist auf die Gesundheitsunbedenklichkeit und Sicherheit von Cobalt-Chrom Medizinprodukten besonderer Wert zu legen<sup>35</sup>.

### 1.3.3 Titan und seine Legierungen

Titan wurde erst relativ spät im Vergleich zu den anderen Metallen als Implantatmaterial entdeckt. 1965 wurden von der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese (AO/ASIF) dynamische Kompressionsplatten und dazugehörige Schrauben aus reinem Titan hergestellt<sup>7</sup>. Zum heutigen Standpunkt ist es durch seine herausragenden Eigenschaften eines der am häufigsten verwendeten Materialien für metallische Orthopädie- als auch Zahnimplantate. Dabei finden reines Titan (cp=commercially pure) sowie die beiden Legierungen mit Vanadium (TiAl6V4) und Niobium (TiAl6Nb (TAN)) in der Medizin am meisten Anwendung. Reines Titan ist unlegiert und von geringerer Festigkeit als die Legierungen, besitzt allerdings eine hohe Zähigkeit<sup>20</sup>. Der Vorteil von Reintitan sind zudem fehlende Legierungselemente, wie sie in Stahl und CoCr-Implantaten vorhanden sind, und die allergische Reaktionen hervorrufen können<sup>36</sup>. Bei Patienten mit bekannter Nickelallergie wird auf Titan anstelle von Stahl zurückgegriffen. Titan ist sehr reaktiv. Dadurch bildet sich rasch eine dichte stabile Oxidschicht aus. Durch die Inertanz dieser Schicht wird eine hervorragende Korrosionsbeständigkeit gewährleistet<sup>13,36</sup>. Auch eine Kombination mit anderen Metallen stellt keine Gefahr dar, da Titan sehr beständig gegen galvanische Korrosion ist<sup>20</sup>. Die Passivschicht wird nach mechanischer Zerstörung sofort wieder hergestellt und schützt so das Implantat<sup>7</sup>. Allerdings ist die Passivschicht porös und brüchig und birgt das Risiko, bei Verschleiss Abriebteilchen in das Gewebe abzugeben. Diese Teilchen können ungewünschte Gewebereaktionen hervorrufen, die ein aseptisches Lösen des Implantates begünstigen könnten<sup>27</sup>. Um Versprödungsgefahr zu minimieren muss der Wasserstoffgehalt niedrig gehalten werden, dies wiederum macht die Herstellung aufwendig und teuer. Durch die geringe Abriebbeständigkeit ist Titan nicht für den Gelenkersatz geeignet. Auch bei instabilen Osteosynthesen können leicht Verschleisspartikel entstehen<sup>36</sup>. Die problematische Verschleissbeständigkeit lastet Titan und seinen Legierungen als Manko an. Trotzdem nehmen Titan/-legierungen durch ihre gute Kombination von Festigkeit, Elastizität und herausragender Biokompatibilität eine Sonderstellung ein. Das niedrige Elastizitätsmodul (110 GPa), mit bedingt durch die geringe Steifigkeit, ähnelt dem des corticalen Knochens (10-15



GPa) von allen Metallen am meisten und gewährleistet so eine gute Lastübertragung vom Implantat auf den Knochen. *Stress-shielding* (*Stressprotektion*) wird so minimiert und neue Knochenbildung kontinuierlich angeregt<sup>16,37,38</sup>. Titanimplantate können gut als Langzeit-Implantate eingesetzt werden, da sie sehr gut in den Knochen integriert werden. Das Risiko einer Implantatlösung mit folgendem Versagen wird so deutlich reduziert<sup>16</sup>. Die ausgezeichnete Biokompatibilität von Titan lässt sich an der guten Reaktion des umliegenden Gewebes auf das Implantat festmachen. Ebenso bleiben allergische Reaktionen aus<sup>7</sup>. Eine Toxizität gegenüber Makrophagen und Fibroblasten konnte *in vitro* nicht festgestellt werden und somit bleibt eine zytotoxische Reaktion im perimplantären Gewebe aus<sup>8,9</sup>. Titanimplantate wiegen nur ca. 45% des Gewichtes von Stahl und Cobalt-Chrom Implantaten, was gerade beim Einsatz von grossen Implantaten ein wichtiger Komfortfaktor für den Patienten darstellt<sup>39</sup>. Einen weiteren Vorteil gegenüber Stahl und Cobalt-Chrom zeigt Reintitan bei der Diagnostik im Magnet-Resonanz-Verfahren. Titan ist nicht ferromagnetisch, fügt somit dem Patienten bei dieser Art der Bildgebung keinen Schaden zu und reduziert den Störfaktor im Vergleich zu den anderen Materialien um bis zu 40%<sup>7,40</sup>. Nachteile wären, neben der geringen Abriebbeständigkeit, die relativ aufwendige Herstellung, die einen höheren Materialpreis erfordert<sup>41</sup>. Durch eine geringere Duktilität, im Vergleich zu Stahl, entstehen Nachteile bezüglich der Anbiegbarkeit. Titan reagiert sensibler als Stahl auf Oberflächenverletzungen, welche beim intraoperativen Anpassen der Implantate entstehen können. Das gute Einwachsverhalten von Titan kann, im Falle einer gewünschten Entfernung der Implantate, die Extraktion erschweren.

#### **1.3.3.1 TAN**

Titan besitzt eine  $\alpha$  Struktur die sich nur bei Temperaturen über 882° C in eine  $\beta$  Struktur umwandelt. Das Herstellen von Legierungen ermöglicht es, dass diese Strukturen jedoch auch bei niedrigeren Temperaturen bewahrt werden können<sup>7</sup>. Vergleicht man die  $\alpha + \beta$  Legierungen (zu denen TAN gehört) mit Reintitan so bieten sie eine verbesserte Festigkeit und können so für Indikationen mit hoher Beanspruchung genutzt werden. Gleichzeitig gehen sie aber auch mit einer geringeren Zug- und Biegeduktilität einher und sind daher für Implantate, die eine verstärkte Formanpassung benötigen, ungeeignet<sup>36,41</sup>. Die Titan-Aluminium-Niobium Legierung besitzt eine  $\alpha + \beta$  Struktur<sup>7</sup>.

Titanlegierungen gelten ebenfalls als äusserst biokompatibel. Ti6Al4V (TAV) (Al = Aluminium, V = Vanadium) ist eine der gebräuchlichsten Legierungen in der Orthopädie wird aber zunehmend verdrängt durch Ti6Al7Nb (TAN) (Nb = Niobium). Grund dafür ist die potentielle Zytotoxizität von Vanadium. So konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass Ionen aus Ti6Al4V-Legierungen eine Differenzierung von Knochenmarks-Stromazellen in reife Osteoblasten hemmen und so Implantatversagen begünstigen können<sup>42-44</sup>. Abhängig von der Konzentration und vom oxidativen Stress konnte Vanadium auch ein zytotoxischer Effekt auf osteoblastische Zellen nachgewiesen werden<sup>45</sup>. In einer weiteren *in vitro* Studie konnte an humanen Monozyten, die Ti-6Al-4V-Partikeln ausgesetzt wurden, eine erhöhte Freisetzung von Entzündungsmediatoren, im Vergleich zu Zellen die in Kontakt mit Ti-6Al-7Nb-Partikeln kamen, festgestellt werden. Allerdings treten entzündliche Reaktionen nur bei sehr grossen Mengen Abriebpartikeln auf<sup>41</sup>. Niobium hingegen scheint eines der sichersten Legierungselemente für Titan zu sein in Bezug auf die Toxizität und Allergieauslösung<sup>13</sup>. Osathanon et al verglichen in ihrer *in vitro* Studie die Antwort von humanen Osteosarkomzellen auf Reintitan und auf TAN. Dabei konnte nach 4 Stunden eine bessere Ausbreitung derjenigen Zellen festgestellt werden, die mit TAN in Kontakt waren. Diese Zellen produzierten auch mehr Fibronectin und Osteopontin. Die Synthese dieser Proteine wirkt sich positiv auf die Osseointegration aus<sup>46</sup>.

Ti6Al7Nb (TAN) ähnelt in seinen Eigenschaften der Vanadiumlegierung, zeichnet sich allerdings durch eine höhere Biokompatibilität aus. Die Korrosionsbeständigkeit ist im Vergleich mit der Vanadiumlegierung verbessert und ist vergleichbar mit der von Reintitan<sup>44,47</sup>. Zusätzlich besitzt TAN eine höhere Duktilität als TAV. Bezüglich der Festigkeit ist die TAN Legierung vergleichbar mit TAV. Diese wird bereits als Titan-Legierung mit besonderer Stärke verwendet, z.B. für Osteosynthese Platten-Schrauben-Systeme, Nägel, aber auch in der Dentalimplantologie<sup>47</sup>. Wie auch bei den Titanimplantaten, treten bei Titan-Legierungen die MRI Artefakte im Vergleich zu Stahlimplantaten in deutlich geringerem Umfang auf<sup>41</sup>.

### 1.3.4 Zirkonium

Zirkonium zählt wie Titan auch zu den Schwermetallen. Analog zu Titan handelt es sich um ein reaktives Material. Bei Kontakt mit der Luft wird die Oberfläche des Metalls mit einer Oxidschicht bedeckt. Es entsteht Zirkoniumdioxid ( $\text{ZrO}_2$ ). Dieses Metalloxid verhält sich bioinert und ist nicht resorbierbar. Der Charakter der oxidierten Oberfläche führt dann zur Zuordnung in die Gruppe der Keramik<sup>48</sup>. Oxidkeramiken sind härter und

verschleissbeständiger, allerdings auch spröder als Hartmetalle<sup>49</sup>. Kennzeichnend für Zirkoniumimplantate sind die ausserordentliche Korrosions- und Abriebbeständigkeit. Des Weiteren zeigen sie eine gute Biokompatibilität, hohen Bruchwiderstand und hohe Biegefestigkeit<sup>50</sup>. Aufgrund der guten mechanischen Eigenschaften wird das Material präferiert in der Hüftendoprothetik eingesetzt und aufgrund seiner Farbgebung auch gerne für Zahnimplantate angewendet<sup>49</sup>. Das Einsatzgebiet in der Orthopädie ist weit reichend mit guten Langzeitergebnissen<sup>51</sup>. Seit nunmehr über 20 Jahren werden Zirkonium-Keramikimplantate als Femurköpfe für Hüftimplantate eingesetzt. In verschiedenen *in vivo* Studien, in denen das Osseointegrationsverhalten von Titan und Zirkonium verglichen wurde, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Materialien festgestellt werden<sup>48,52-54</sup>. In der Kaninchenstudie von Hoffmann et al. zeigten Zirkoniumimplantate nach 2 Wochen etwas mehr Knochenapposition als die Titankontrollgruppe und nach 4 Wochen nur geringfügig niedrigere Werte, und das trotz einer im Vergleich weniger rauen Oberfläche, was den Rückschluss auf eine sehr gute Biokompatibilität des Materials zulässt<sup>51</sup>. Scarano et al. konnte selbst an Implantaten ohne Oberflächenmodifizierung eine bedeutende Biokompatibilität festhalten. Grundlage hierfür war das Ausbleiben von Lücken, Bindegewebe, mehrkernigen Zellen und Entzündungszellen an der Knochen-Implantat-Grenzfläche<sup>53</sup>.

#### **1.4 Ziel der Studie**

Die verschiedenen Metallimplantate sollten anhand eines Beckenmodells am Schaf auf ihre Osseointegration und Biokompabilität untersucht werden. Die Firma Synthes hat eine Kopfverriegelungsschraube entwickelt deren Prinzip darauf beruht, die Fraktur zu fixieren gleichzeitig jedoch dem Knochen Dynamisierung zu gewährleisten. Ein Kopfverriegelungspin ermöglicht durch seine Verbindung mit der Schraubenhülse nur eine begrenzte Bewegungsfreiheit des Schraubenkopfes während dessen jedoch eine Stabilität zwischen Gewindehülse und Knochen sowie zwischen Schraubenkopf und Platte erhalten bleibt. Die so entstehenden Mikrobewegungen sollen eine schnellere Frakturheilung ermöglichen<sup>55</sup>. Neben dem optimalen Wirkprinzip gilt es auch, den optimalen Werkstoff für diese Schraube zu bestimmen. Sehr häufigen Einsatz in der orthopädischen und traumatologischen Chirurgie finden heutzutage Titan und Stahlimplantate. Titan bereitet jedoch häufig Probleme bei der Explantation der Implantate. Titan-Legierungen besitzen im Vergleich zum Reintitan eine höhere Festigkeit. Der Nutzung von Titan-Aluminium-Vanadium Legierungen, die momentan

bereits auf dem Markt sind wird jedoch kritisch gegenüber gestanden, da eine potentielle Toxizität von Vanadium nicht auszuschliessen ist. Aufgrund dessen werden in dieser Studie 2 unterschiedliche Titan-Aluminium-Niobium Legierungen auf ihre Osseointegration untersucht. In der Wirbelsäulenchirurgie wird TAN bisher gerne eingesetzt da es, wie in diesem Medizinzeig erwünscht, stark einwächst. Cobalt-Chrom besitzt eine höhere Festigkeit und Stabilität als TAN. Die Frage lautet ob eine Beschichtung von Cobalt-Chrom Schrauben mit Titan sowie mit Zirkonium, die Osseointegration auf das Niveau von Titan/TAN erhöht und wiederum ein Vorteil durch die hohe Festigkeit von Cobalt-Chrom in sich birgt. TANST und TANNEW können somit auch als Vergleichsreferenz zu den Cobalt-Chrom Schrauben herangezogen werden. Stahlimplantate (316L) haben sich lange Zeit bewährt und Massstäbe gesetzt in Hinblick auf die gute Entfernbareit der Implantate, liegen jedoch im Vergleich in punkto Korrosionsbeständigkeit und Biokompatibilität, trotz guter Biokompatibilität, hinter den anderen Materialien zurück. Stahlschrauben wurden in dieser Studie als „Referenzen“ mit getestet. TAN/Titan setzen Massstäbe bezüglich ihres guten Osseointegrationsverhaltens bei gleichzeitiger exzellenter Biokompatibilität. Je nach Applikation und Anwendungsdauer sind verschiedene Eigenschaften wünschenswert. Ziel der Studie ist es, anhand verschiedener Parameter wie z.B. der Beschichtung der Materialien die Modulierbarkeit der Osseointegration zu testen und die verschiedenen Implantatmaterialkonfigurationen zu vergleichen. Somit kann Nutzen und Einsatz der verschiedenen Implantate optimiert werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Aufbau der Studie**

Für die Studie wurden 7 weibliche, ausgewachsene Schafe (Schweizer Alpenschafe) verwendet. Das Durchschnittsalter der Tiere ergab 3 Jahre und 3 Monate (2,5 Jahre - 4,2 Jahre), das Durchschnittsgewicht lag bei 76,9 kg (51-98 kg).

Die Schafe wurden in 3 Gruppen zu je 2 Tieren eingeteilt, das 7. Schaf bildete alleine die letzte Gruppe. Das Untersuchungsintervall belief sich bei allen Tieren nach dem Operationstag auf 8 Wochen.

Den Tieren wurde beidseits, dorsolateral ein chirurgischer Zugang zum Becken präpariert (Abb.1)um dann dort an der Beckenschaufel an je 9 verschiedenen Positionen ein Implantat einzusetzen (Abb.2).

## 2.2 Implantate

Vier (4) verschiedene metallische Implantatwerkstoffe, teils beschichtet oder poliert wurden auf ihre Osseointegration untersucht, wobei dafür die Form von Schrauben verwendet wurde. Bei den eingesetzten Schrauben handelte es sich um Kopfverriegelungsschrauben mit einem normalen, nicht schneidenden Gewinde und einem Schraubenkopf mit einem Aufsatz für einen T15 Stardrive Schraubenzieher. Alle Schrauben waren 14 mm lang mit einem Gesamt-Durchmesser von 3,5 mm und einem Kern von 2.8mm (Abb.3-7).

Die zu testenden Materialkonfigurationen waren:

- Stahl (Steel) (Rostfrei 316L)
- Cobalt Chrom (CC)
- Cobalt Chrom / Titan Beschichtung (CCTC)
- Cobalt Chrom / Zirkonium-Titan Beschichtung (CCZTC)
- Reintitan (PTST) (cp = commercially pure)
- TAN (Titan-Aluminium-Niobium) Standard (TANST)
- TAN new finish (TANNEW).

Stahl, Reintitan und TAN sind bereits seit langer Zeit kommerziell erhältlich und dienen als Referenzen. CC ist seit Jahren für die Endoprothetik, Dentaltechnik und vereinzelt auch als Ostesynthese-Schrauben Material mit und ohne Beschichtung im Einsatz und soll nun für die Anwendung als Schraubenmaterial hin getestet werden. Von jeder Gruppe wurden insgesamt 18 Implantate eingesetzt, wobei je 9 verschiedene Implantate einer Beckenseite zugeteilt wurden. Die Positionen der Schrauben wurden in einem randomisierten Verfahren festgelegt, so dass jede Position mindestens einmal mit jedem Material besetzt war.

Da nur 7 Materialkonfigurationen getestet wurden, insgesamt aber 9 Bohrlöcher pro Beckenseite zur Verfügung standen, konnten an den Positionen 8 und 9 im selben Schaf 2 Schraubentypen doppelt belegt werden (Tab.1).

### 2.2.1 Implantatherstellung und –oberflächen

Die Herstellung der Schrauben erfolgte in maschineller Bearbeitung durch das Drehverfahren, d.h. die Gewinde wurden gewirbelt. Anschliessend wurden verschiedene Oberflächenbearbeitungsmethoden eingesetzt.

- Stahl – Elektropolierung; durchschnittlichen Rauigkeit: ca. 0.22  $\mu\text{m}$

- Cobalt-Chrom – Passivierung; durchschnittlichen Rauigkeit: ca. 0.22  $\mu\text{m}$  (entlang des Gewindes)
- Titan/ Titanlegierungen (TAN) – elektrochemische Anodisierung; durchschnittliche Rauigkeit: ca. 0.32  $\mu\text{m}$
- TAN new finish – zusätzlich poliert-elektrochemisch Anodisiert; durchschnittlichen Rauigkeit: ca. 0.28  $\mu\text{m}$  (Abb. 3-7)

## 2.3 Tierversuch

Bewilligt wurde die chirurgische Studie, entsprechend den gesetzlichen Voraussetzungen des schweizerischen Tierschutzgesetzes, vom Kantonalen Veterinäramt Zürich (Bewilligungsnummer:19/2009).

## 2.4 Schafmanagement

Die Schafe wurden für die Studie angekauft. Die Ankaufsuntersuchung beinhaltete unter anderem eine allgemeine klinische Untersuchung, die Bestimmung des Alters anhand der Zähne, sowie Klauenpflege und eine intravenöse Blutentnahme. Das aus der Vena jugularis mittels Vacutainer-System (Vacurette®, greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich) entnommene Blut wurde zur serologischen Kontrolle auf Maedi/Visna-Antikörper an das Virologische Institut der Vetsuisse-Fakultät Bern gesendet. Positiv getestete Tiere wurden von der Studie ausgeschlossen, der zuständigen Behörde gemeldet und umgehend geschlachtet. Des Weiteren wurde eine sonographische Trächtigkeitsuntersuchung, sowohl transrektal als auch transabdominal, durchgeführt. Trächtige Mutterschafe wurden ebenfalls von der Studie ausgenommen. Bei negativem Ultraschallbefund wurde einmalig Prostaglandin F2 $\alpha$  appliziert (1mg/Schaf Dinolytic®, Pfizer AG, Zürich, Schweiz).

Angekauft wurden nur Tiere, die einen guten Allgemein-, Ernährungs- und Klauenzustand aufwiesen, diese wurden dann mit einer bestandeseigenen Ohrmarke gekennzeichnet. Alle angekauften Tiere wurden gegen Moderhinke (1ml /Schaf Footvax ad us. Vet.®, Essex Tierarznei, Provet AG Lyssach, Schweiz) sowie gegen Pasteurellen und Clostridieninfektionen (2ml/Schaf Ovilis® Heptavac P, Intervet Veterinaria AG Zürich, Schweiz) geimpft. Die Impfungen werden routinemässig im Jahresturnus wiederholt. Zusätzlich wurden die Tiere entwurmt mit Moxidectin (1ml/5 kg Cydectin® Provet AG Lyssach, Schweiz), je nach Infektionsdruck und Befallssituation auch ergänzend bzw. alternierend durch ein weiteres Antiparasitikum (z.B. 4ml/10 kg Hapadex® 5% Essex Tierarznei, Provet AG Lyssach, Schweiz).

Eine gründliche Klauenpflege wurde vorgenommen und im 6-wöchigen Turnus wiederholt.

Die komplette Herde wird zweimal jährlich (Frühjahr /Herbst) geschoren.

Die jährliche Blauzungenimpfung wurde vom zuständigen Tierarzt des Kantons vorgenommen.

## **2.5 Präoperative Vorsorge**

Zwei Wochen vor der Operation wurden die Tiere zur Eingewöhnung vom Staffelegghof in das Tierspital Zürich transportiert und dort aufgestellt. 48 Stunden vor dem Eingriff wurden die Tiere gewogen sowie einer erneuten Klauenpflege und Blutuntersuchung (kleines Hämatogramm und Chemogramm) unterzogen. Die Ergebnisse der Blutuntersuchung dienten zur Minimierung möglicher Anästhesie- und Operationskomplikationen. Des Weiteren wurden die entsprechenden Körperpartien für das Operationsfeld geschoren und eine Halsseite im Bereich der Vena jugularis für das Platzieren des Katheters. Den Tieren wurde 24 Stunden vor der Operation das Futter entzogen um Regurgitationen während der Operation zu vermeiden. Der Zugang zum Wasser blieb den Schafen weiterhin erhalten.

## **2.6 Operation**

### **2.6.1 Operationsvorbereitung**

Am Tag der Operation wurden die Tiere erneut einer klinischen Untersuchung in Form von Auskultation der Lunge und des Herzens unterzogen. Die Prämedikation erfolgte intramuskulär mit dem Sedativum Xylazin (0,1 mg/kg Rompun® 2%, Bayer Heath Care, Provet AG Lyssach, Schweiz) und dem Analgetikum Buprenorphin (0,01 mg/kg Temgesic®, Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz). 30 Minuten nach Verabreichung dieser Medikamente wurde den Tieren dann im Operationssaal ein Venenverweilkatheter (BD Angiocath® 14 GA, Becton Dickinson AG, Schweiz) in die Vena jugularis platziert. Über diesen erhielten die Schafe zur peri- und postoperativen Infektions-, Schmerz- und Entzündungsprophylaxe am Tag der Operation sowie an drei darauf folgenden Tagen (Penicillin (12-stündiger Dosierungsintervall) (30000 IE/kg Penicillin Natrium Streuli®, Streuli Pharma AG Uznach, Schweiz), Gentamicin (4 mg/kg Vetagent®, Veterinaria AG, Zürich) und Carprofen (4 mg/kg Rimadyl®, Pfizer AG, Zürich, Schweiz)). Zudem wurde einer Erkrankung an Tetanus vorgebeugt durch

eine einmalige, subkutane Injektion von equinem Tetanusantitoxin (3000 IE/Tier Tetanus-Serum Intervet®, Veterinaria AG, Zürich, Schweiz).

Die Einleitung der Narkose erfolgte mit Diazepam (0,1 mg/kg Valium®, Roche Pharma AG, Reinach, Schweiz), Ketamin (3-5 mg/kg Narketan 10®, Vetoquinol AG, Belp-Bern, Schweiz) und Propofol (0,2-0,4 mg/kg 1% MCT Fresenius®, Fresenius Kabi AG, Stans, Schweiz).

Nach lokaler Betäubung mit 1-2 Sprühstößen Lidocain (Xylocain® 10% Spray, AstraZeneca AG, Zug, Schweiz) des Kehlkopfes wurden die Schafe intubiert (Tubusgrösse 11 oder 12) und die Narkose anschliessend als Inhalationsnarkose mit 1-1,5 % Isofluran (Forene®, Abbott AG, Baar, Schweiz) aufrechterhalten. Das Monitoring während der Narkose erfolgte über Pulsoxymetrie, Kapnographie, EKG und invasive Blutdruckmessung an der Arteria auricularis. Während der gesamten Dauer der Operation erhielten die Schafe eine Ringer-Laktat-Infusion (10 ml/kg/h) sowie eine Propofol-Dauerinfusion per Spritzenpumpe (1 mg/kg/h).

Zur zusätzlichen Schmerzausschaltung wurden die Tiere für eine Epiduralanästhesie zunächst in Sternallage gebracht. Unter aseptischen Bedingungen wurde die Epiduralanästhesie mit Morphin-HCL (0,1 mg/10 kg KG verdünnt auf 2 ml mit steriler Kochsalzlösung, SINTETICA SA, Mendrisio, Schweiz) im Foramen lumbosacrale gesetzt. Hierfür wurde die Nadel senkrecht zum Becken durch das Foramen lumbosacrale sowie durch die Bänder, einschliesslich des Ligamentum flavum, in den Epiduralraum geführt. Das Führungsstilet der Nadel wurde entfernt und der korrekte Sitz der Nadel durch Injektion von steriler Kochsalzlösung, anhand des fehlenden Widerstandes beim Injizieren kontrolliert. Anschliessend erfolgte die Positionierung in Seitenlage mit angehobenem Becken (Abb.1) zunächst mit Zugang zum rechten Becken, nach erfolgter Operation Umlagerung für die linke Seite.

Das Operationsfeld wurde standardmässig antiseptisch vorbereitet mit Hibiscrub® (SSL Healthcare Schweiz AG, Pratteln, Schweiz), 80% Alkohol und Desinfektionsspray (Hibitane®, G.Streuli & Co AG, Uznach, Schweiz). Anschliessend wurde das OP-Feld mit einem sterilen Tuch abgedeckt.

### **2.6.2 Chirurgicaler Eingriff**

Der operative Zugang zum Becken erfolgte mittels eines ca. 13 cm langem Hautschnittes, von der Mitte der Crista iliaca ausgehend ca. 3 cm nach kranial und 10 cm nach kaudal in longitudinaler Verlaufsrichtung des Ileums. Mit Hilfe eines Elektroauters konnten das subkutane Fettgewebe sowie die Faszie durchtrennt, und



gleichzeitig entstandene Blutungen gestillt werden. Zwischen den Muskelbäuchen des Musculus tensor fasciae latae und des Musculus gluteus medius wurde stumpf in die Tiefe präpariert bis zum Erreichen des Os ilii. Von diesem wurde der Ansatz der bereits genannten Muskeln, sowie des Musculus gluteus profundus und des darunter liegenden Periosts mithilfe eines Raspatoriums gelöst bis der gewünschte Teil des Beckenkamms freigelegt war. Dabei wurde ca. 1/3 des Muskelansatzes am Ileum intakt belassen. Langenbeck Wundhaken und ein Rippenspreizer nach Finochietto dienten der Retraktion der Muskelbäuche nach außen, um ein möglichst großes Sicht- und Operationsfeld zu gewährleisten. Eine Alu-Bohrschablone mit standardisierten Aussparungen wurde auf der Linea glutea platziert und temporär mit einer Klemme fixiert um beidseits der Schablone die Löcher für die Implantate zu bohren (Abb.8 und 9). Dafür wurde ein Ø 2,8 mm Spiralbohrer plus entsprechender Bohrhülse (mit Bohrstop versehen) verwendet. Manuell wurde mit einer selbstschneidenden Ø 3,5 mm LCP Stahl Verriegelungsschraube das Gewinde vorgeschritten, um anschließend die Testschrauben einzusetzen. Ventral der Linea glutea wurden je 5, dorsal je 4 Schrauben eingesetzt. Mit einem T 15 Stardrive Schraubenzieher wurden die Schrauben angezogen. Anschliessend wurde die Muskulatur reponiert und der Sehnenansatz an seinem Ursprung mit einer fortlaufenden Naht fixiert (Polyglactin, Vicryl® 2/0 Johnson & Johnson Int., Brüssel, Belgien). Der Verschluss von Faszie und Subkutis erfolgte auf die gleiche Art und Weise. Für die Adaption der Haut wurden Staples (Auto Suture Appose ULC®, United States Surgical, Norwalk, USA) verwendet. Des Weiteren wurde zum Schutz der Operationswunde eine sterile Gaze mit Staples an der Haut über der Wunde befestigt. Die ganze Prozedur wurde dann auf der linken Seite wiederholt, so ergab sich insgesamt eine Operationszeit von ca. 2 Stunden.

Die Tiere erhielten eine projektbezogene Ohrmarke im Austausch gegen die bestandseigene und elektronische Chips wurden zur eindeutigen Identifizierung seitlich am Hals subcutan platziert (RID® DATA MARS SA, RF-Identification Technology, Bedano-Lugano, Schweiz).

## **2.7 Postoperatives Management**

Nach der Operation wurden die Tiere zum Aufwachen in die Boxen zurück verbracht. Sobald bei den Schafen der Schluckreflex einsetzte, wurden sie extubiert. Nach dem Aufstehen wurde ihnen Heu und Wasser angeboten. Die Schmerztherapie mit Buprenorphin wurde noch 3-mal im Abstand von 4 Stunden fortgesetzt. Ebenso

erhielten die Tiere abends erneut Benzylpenicillin. Gentamicin und Carprofen wurden erst am nächsten Morgen, sowie an den 2 darauffolgenden Tagen, in 24-stündigem Abstand verabreicht. Zur Rekonvaleszenz wurden die Tiere für 24 Stunden in den Boxen des Tierspitals belassen und dann erst wieder in die Räume des Strickhofs transportiert. In diesen Boxen blieben die Tiere etwa 10 bis 14 Tage und wurden täglich auf Allgemeinzustand und Belastung vor allem der Hintergliedmassen kontrolliert. Nach 4 Tagen post operationem wurde der Venenkatheter nach der letzten Injektion entfernt sowie auch der Gazetupfer, der zum Schutz der Wunde diente. Die Staples wurden je nach Heilungsprozess der Hautwunde 10 bis 14 Tage nach der Operation entfernt.

### **2.8 Fluoreszenzmarkierung**

Fluorochrom-Marker wurden eingesetzt um die Dynamik des Knochenneubaus besser beurteilen zu können. Die Fluorochrome binden an das Calcium im Blut und werden auf diesem Wege in Form von Hydroxyapatitkristallen in der Knochenmatrix eingelagert. So können Mineralisationen im Histologieschnitt detektiert und bestimmten Zeitpunkten zugeordnet werden<sup>56</sup>.

Als Fluoreszenz-Marker verwendet wurden Calcein-Grün (10mg/kg KG) und Xylenol-Orange (90mg/kg KG). Calcein-Grün wurde 4 Wochen nach der Operation verabreicht, Xylenol-Orange 48 Stunden vor Schlachtung der Tiere. Die Verabreichung der Fluoreszenz-Farbstoffe erfolgte subkutan und auf Portionen verteilt, die 20 ml nicht überschritten. Die Marker wurden von einer Mitarbeiterin des Tierspitals jeweils frisch zubereitet. Ein Fluoreszenzmikroskop mit entsprechenden Filtern (L5 für Calceingrün; N3 für Xylenolorange) diente der Sichtbarmachung der Fluoreszenz-Farbstoffe (Leica DM6000 B, Kamera: DFC350 FX).

### **2.9 Probengewinnung und –aufbereitung**

Alle Schafe wurden 8 Wochen nach der Operation geschlachtet. Die Tiere wurden in der Schlachthalle des Tierspitals zunächst mit einem Bolzenschuss betäubt und dann per Blutentzug getötet. Nach Häutung, Eviszeration und der Spaltung des Tierkörpers in 2 Hälften wurden die Beckenknochen freipräpariert. Die Muskulatur wurde weitestgehend abpräpariert und die Implantationsstellen makroskopisch auf Entzündungszeichen sowie anderweitige Veränderungen untersucht. Dokumentiert wurde alles mittels digitalen Photographien. Dabei wurde eine Übersichtsaufnahme des Beckenknochens gemacht sowie Detailaufnahmen der Implantatreihen. Mit dem Faxitron (LX 60 Laboratory

Radiography System®, faxitron x-ray corporation, Lincolnshire, Illinois, USA) wurden anschließend Makroradiographien der Knochen in 2 Ebenen angefertigt. Dorsoventral wurden 55 kV über 12 sec. angewendet, laterolateral 60 kV über 12 sec. Für die weitere Auswertung wurden die Beckenknochen mit einer Bandsäge (Kolbe® Typ K 410, Nitrotechnik Maschinenbau, Riniker AG, Rapperswil) in kleine Blöcke mit jeweils einem Implantat gesägt von denen die 9 Blöcke der linken Beckenseite zur histologischen Auswertung verwendet wurden und die 9 Blöcke der rechten Seite zum Torque-Ausdreh-Test. Für den Torque-Test wurden die Proben zunächst feucht gehalten und gekühlt gelagert um am nächsten Tag ins ARTORG-ISTB Forschungszentrum (Institut für Chirurgische Technologien und Biomechanik) der Universität Bern verbracht zu werden. Der Torque-Removal-Test wurde durchgeführt um das Drehmoment, bis zum Lösen des Implantates aus der Knochenverbindung, zu bestimmen. Hierfür wurden die Proben in einer Gipsmasse (Dental Plaster, GC Fujirock® EP, GC Europe, Leuven, Belgien) in ca. 7 x 3 x 2 cm großen Formen eingebettet (Abb.11). Nach Aushärten der Gipsmasse wurde der Implantatkopf über einen T15 Stardrive-Schraubenziehereinsatz an einer servohydraulischen Testmaschine (MTS Mini Bionix 858, MTS Systems Corporation, Eden Prairie, USA) befestigt (Abb.12). Der Schraubenziehereinsatz ließ sich axial frei verschieben um das Ausdrehen des Implantates nach oben nicht zu behindern bzw. zu beeinflussen. Der Gipsblock mit jeweils 2 Implantaten wurde in eine Aluminiumform gesenkt, diese wurde mit einer Legierung (Ostalloy 117, Metallum AG Pratteln, Schweiz) ausgegossen, deren Schmelzpunkt bei 47° Celsius lag. Durch das Aushärten der Metalllegierung wurde der Gipsblock fixiert und es wurde so verhindert, dass das Drehmoment durch Scherkräfte beeinflusst wird. Der Kurvenverlauf des Ausdrehmomentes wurde festgehalten und ausgewertet. Anschließend wurden die Testschrauben per Hand ausgedreht und in 70% Alkohol konserviert.

Die anderen 9 Proben der linken Seite wurden in 40% Alkohol in 75ml Gläsern aufbewahrt und auf einem Schüttler für 7 Tage belassen um dann die Alkoholreihe aufsteigend wie folgt weiterzuführen.

- 3 x 30 min in 50%igem Alkohol
- 2 x 12 h in 70%igem Alkohol
- 2 x 12 h in 80%igem Alkohol
- 1 x 12 h in 90%igem Alkohol
- 1 x 12 h in 96%igem Alkohol

- 4 x 12 h in 100%igem Alkohol
- 1 x 24 h in Xylol im Vakuum
- 1 x 72 h in Xylol im Vakuum

Um die Proben angebrachte Aluminiumfolie verhinderte das Ausbleichen des Fluoreszenzmarkers während dieser Zeit. Bei Erreichen des 70% Alkohols wurden auch die Proben der Histologieauswertung im ARTORG-ISTB für die korrekte spätere Einbettung genau in Achse gesägt (Proxxon GmbH, Niersbach, Deutschland). Dies ist notwendig um die Proben beim Anfertigen der histologischen Schnitte später genau in der Längsachse zu treffen. Die Achse des Implantates wurde über den Einsatz eines T15 Stardrive-Schraubendreheraufsatz, der in einer speziell für diesen Zweck hergestellten Vorrichtung eingebaut ist, ermittelt.

Durch die Alkoholreihe wurden die Proben entwässert und anschließend durch Xylol unter Vakuum bei Raumtemperatur entfettet. Ebenfalls unter Vakuum erfolgte dann bei 4° C für 7-10 Tage eine Infiltration in Methylmethacryatlösung (MMA). Die Zusammensetzung des MMA's erfolgte aus Methacrylacid-methylester (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz), Dibutylphthalat (Merck-Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland) und Perkadox 16 (Dr. Grogg Chemie AG, Stetten, Schweiz) im Verhältnis 89,5:10:0,5. Nach diesen Tagen erfolgte die Einbettung in Plastikformen, ebenfalls mit MMA, wobei die Proben mit der in Bern parallel zur Längsachse der Testschrauben gesägten Knochenseite nach unten liegend eingebettet wurden. Das Aushärten des MMA's benötigte zwischen 2 und 3 Tagen bei Raumtemperatur. Die so entstandenen Plastikblöcke konnten dann, mit Hilfe eines mit Technovit (Technovit 3040®, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland) aufgeklebten Plastikrahmens, in die Innenlochsäge (Leica SP 1600®, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) bzw. je nach Material auch in eine Spannvorrichtung der Diamantbandsäge (EXAKT Band System 300/301®, Norderstedt, Deutschland) eingespannt und in Schnitte gesägt werden. Die Schnittdicke betrug zwischen 350 µm und 500 µm, wobei die dünneren Schnitte für die Fluoreszenzmikroskopie genutzt wurden und die dickeren für die Mikroradiographie sowie die histologische und histomorphometrische Auswertung. Zur Dokumentation wurden Mikroradiographien mit 28 kV und 11 sec in einem Faxitron (Cabinet x-ray faxitron series, model 43855 A, Hewlett Packard, Mc Minville Division, Oregon, USA) auf hochauflösenden Folien (Fuji Photo Film Co® Ltd. Tokyo, Japan) geschossen (Abb.13). Anschliessend wurden die Dickschnitte auf Akryl-Opalträger geklebt, danach unter Bleigewichten gepresst und am folgenden Tag auf ca. 40-50 µm geschliffen und

poliert (Exakt Mikro Schleifsystem 400 CS®, Norderstedt, Deutschland). Weiter wurden die Schnitte mit Tolidinblau Oberflächen-angefärbt um dann lichtmikroskopisch ausgewertet zu werden.

Die Fluoreszenzschnitte wurden direkt auf Glasobjektträger geklebt und mit Alufolie umwickelt um ein Ausbleichen der Farbstoffe zu verhindern.

## **2.10 Auswertung**

### **2.10.1 Removal-Torque-Test**

Die Ausdrehmomente der unterschiedlichen Schrauben wurden mit Hilfe eines Computerprogramms (Matlab, The MathWorks Inc.) in Nmm gemessen und als Yield Point festgehalten. Die so ermittelten Werte wurden dann miteinander verglichen.

### **2.10.2 Fluoreszenz**

Die Fluoreszenzschnitte wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Leica DM6000 B, Kamera: DFC350 FX) ausgewertet. Es wurden bei 12,5-facher Vergrößerung zwei Bilder von jeder Schraube angefertigt (Schraubenkopf und Schraubenspitze). Die durch Calceingrün (L5-Filter) gefärbten Bereiche kennzeichnen den Knochenumbau nach 4 Wochen (Abb.14), die durch Xylenolorange (N3-Filter) den nach 8 Wochen (Abb.15). Die einzelnen Farbbilder wurden dann mittels automatisierten Computer-Programms übereinander gelegt (Abb.16). Alle diese überlagerten Bilder wurden anhand der Intensität, sowie der Verteilung der Fluoreszenz miteinander verglichen. Des Weiteren wurden die direkten Kontaktflächen der Fluoreszenzbereiche mit dem Implantat, sowie die Konturierung der genannten Bereiche in die Auswertung mit einbezogen.

### **2.10.3 Histomorphometrie**

Für die histomorphometrische Auswertung wurden Toluidinblau-gefärbte Dickschnitte am Makroskop (Leica® M420, Kamera: DFC 320 Leicamicrosystems, Glattbrugg, Schweiz) in das Computerprogramm Leica® IM 1000 Image Manager eingezogen. Es wurde mit einer Vergrößerung von 0.5 x 8 von beiden Seiten des Gewindegangs je eine Übersichtsaufnahme angefertigt. Auf diesen Aufnahmen wurde mit dem Programm Photoshop Elements ein standardisierter Rahmen mit der Grösse 28 x 1,35 cm jeweils implantatnah und implantatfern (Abb.21) über das Bild gelegt. Im dadurch eingegrenzten Bereich wurden die unterschiedlichen Gewebearten wie folgt angefärbt:

- neues Knochengewebe → dunkelgrün
- altes Knochengewebe → hellblau
- Granulationsgewebe → pink
- Implantat → beige
- Hintergrund → schwarz (Abb.22)

Anschliessend wurde mit Hilfe des Programms Leica® QWin der Anteil der verschiedenen Fraktionen ermittelt und dann prozentual ausgewertet.

### **2.10.4 BIC (Bone to implant contact)**

Der BIC beschreibt die Kontaktfläche zwischen dem Knochen und dem Implantat. Hierfür wurden die Gewindezähne der Schrauben anhand der Toluidin-Dickschnitte mit 10-facher Vergrößerung am Mikroskop (Leica® DMR, Kamera: DFC 320) einzeln abfotografiert. Mittels der Software IM 1000 von Leica® wurde zunächst die gesamte Implantatlinie vermessen und dann jeweils nur die Stellen, an denen der Knochen direkten Kontakt zum Implantat aufwies (Abb.23). Danach wurden die Kontaktlinien des Knochens rechnerisch addiert und ins Verhältnis zur Implantatlinie gesetzt um den prozentualen Anteil der BIC zu ermitteln. Diese Auswertung wurde mit allen Gewindezähnen der Unter- und Oberseite bei jeder Schraube durchgeführt. Bei einer exakt mittig getroffenen Schraube sind dies insgesamt 22 Sektoren.

### **2.10.5 Statistik**

Zur Auswertung der quantitativ ermittelten Daten von den Removal Torque-Tests, der Histomorphometrie und der BIC, wurde die spezialisierte Software, SPSS Statistics 17.0, herangezogen. Es erfolgte eine Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen sowie eine graphische Darstellung dieser Werte durch Boxplots. Gesamt Unterschiede zwischen den Implantaten wurden mit einer faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA), für individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen der Post-hoc Test nach Bonferroni angewendet. Statistische Signifikanzen wurden bei p-Werten  $< 0,05$  festgesetzt.

### **3 Resultate**

#### **3.1 Operation und postoperative Phase**

Alle Operationen verliefen störungsfrei, indem keines der Schafe gesundheitliche Probleme während der Operation und der Narkose zeigte. Alle Implantate konnten plangemäss gesetzt werden, nur bei Schaf 4702 verrutschte am linken Becken die Aluschablone beim Bohren etwas nach kaudal, so dass das erste Bohrloch an Position 1 mit einer Platzhalter-LCP Stahl Schraube besetzt und für die zu testende Schraube eine 10. Position weiter distal gebohrt wurde. Um das Risiko einer Beckenfraktur zu minimieren wurde diesem Schaf 4 Wochen Boxenruhe verordnet. Bei dem Schaf mit der Nummer 4704 wurde am rechten Becken das Implantat an Position 2 etwas vorstehend belassen, da die Position relativ nah am Beckenkamm gebohrt wurde. Am linken Becken des Schafs 4707 liess sich die Schraube an Position 9, beim Versuch sie richtig anzuziehen, über den erwarteten Punkt hinaus drehen. Diese Abweichungen wurden auf dem Op-Protokoll registriert und bei der Auswertung entsprechend berücksichtigt. Von insgesamt 63 Implantaten konnten somit 60 plangemäss gesetzt und schliesslich ausgewertet werden und nur bei 3 musste die Auswertung mit Vorbehalt in Angriff genommen werden.

Alle Schafe konnten bereits kurze Zeit nach der Operation wieder aufstehen und begannen sogleich Futter aufzunehmen. Auch im Beobachtungszeitraum bis zur Schlachtung zeigten die Tiere keine Auffälligkeiten und wurden alle planmässig nach 8 Wochen geschlachtet.

#### **3.2 Makroskopische und Radiologische Auswertung**

Bei der Adspektion der Knochen post mortem waren makroskopisch alle Knochen intakt. Es zeigten sich keine Zeichen von Entzündung oder Osteolyse. Teilweise waren die Implantatköpfe vor allem in den proximalen Positionen (1-3) von Knochengewebe überwachsen (Abb.17 und 18). Auf den Röntgenbildern konnte der korrekte Sitz der Implantate bestätigt werden; alle Implantate waren gut in den Knochen integriert und es liess sich kein Osteolysesaum an den Implantaträndern feststellen. Auch Fissuren und Frakturen waren auf den Aufnahmen nicht zu erkennen (Abb.19 und 20)

#### **3.3 Auswertung des Removal-Torque-Tests**

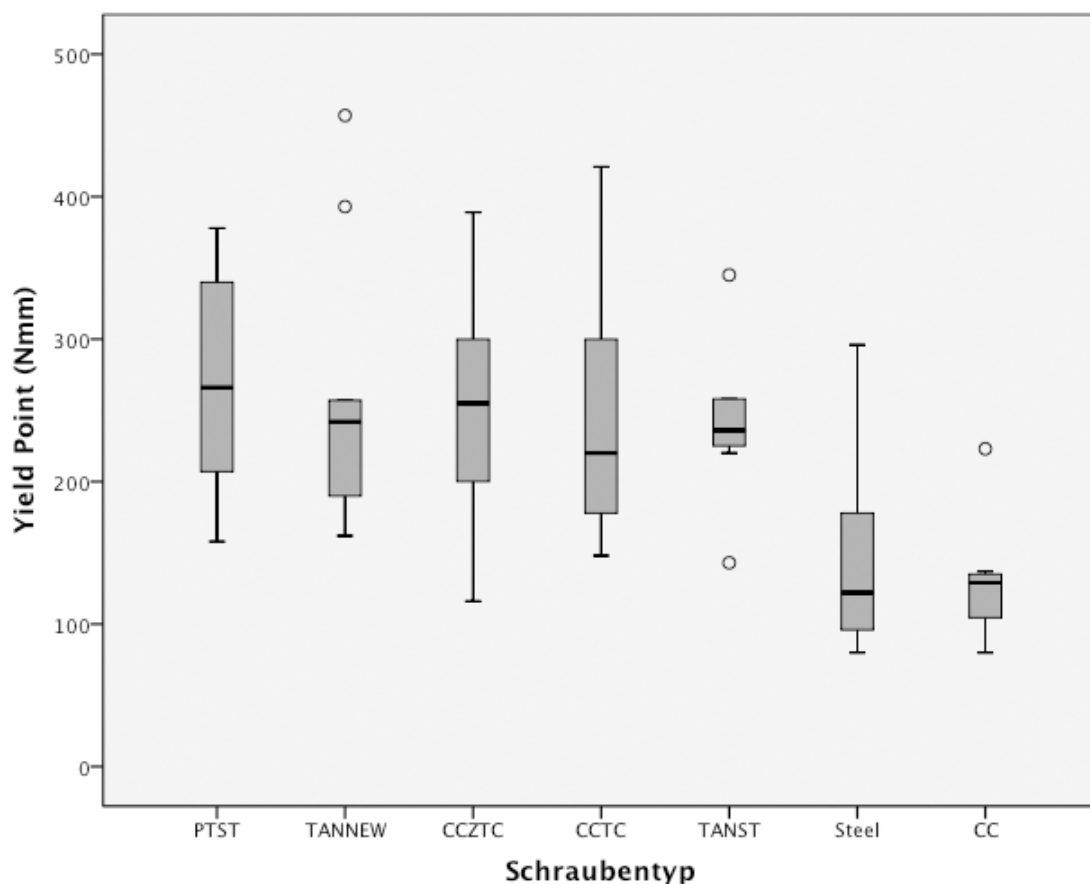
Cobalt-Chrom Schrauben wiesen einen signifikant geringeren Yield-Point [Nmm] (Punkt, ab dem die Schraube aus der Knochenverbindung nachgibt und sich ausdrehen

lässt) auf als die Reintitanschrauben ( $p=0.031$ ), jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied bei den Messwerten im Vergleich zwischen Cobalt-Chrom und Stahl. Diese beiden Schraubentypen zeigten jedoch tendenziell geringere Ausdrehwerte als die übrigen 5 getesteten Materialien. Eine Abhängigkeit der Positionen im Tier zu den Ausdrehwerten liess sich insofern feststellen, so erzielten Schrauben in den cranialen (numerisch höheren) Positionen (6-9) tendenziell geringere Werte als Schrauben in caudalen Positionen (1-5). Es handelte sich jedoch lediglich um Tendenzen und nicht um statistisch signifikante Unterschiede.

Aufgrund eines Programmierfehlers misslang die Datensicherung bei 4701 an Position 8 und 9 sowie komplett bei Schaf 4702. Die Messwerte wurden jedoch direkt bei der Testung vermerkt und konnten so später nachgetragen werden.

Die Messwerte für den Yield Point in Nmm, Standardabweichungen und die Probenanzahl können der Tabelle 2 und Diagramm 1 entnommen werden.

**Diagramm 1: Ergebnisse Torque-Test (Yield Point in Nmm)**



**Legende:** PTST= Reintitan, TANNEW=TAN new standard, CCZTC= Cobalt-Chrom/Zirkonium/Titanbeschichtung  
CCTC= Cobalt-Chrom/ Titanbeschichtung, TANST= TAN Standard, Steel= Stahl, CC= Cobalt-Chrom



Von der Auswertung ausgenommen wurden folgende Proben:

- Schaf 4704 Position 4 CC : bereits angesägt im Zuge der Probenaufbereitung
- Schaf 4705, Position 9 CC : bereits lose vor Anbringung der Testvorrichtung.
- Schaf 4706, Position 1 CCTC : Ausreisser, da Schraubenkopf komplett eingewachsen, extreme Abweichung von Ausdrehwerten der anderen Schrauben
- Schaf 4704, Position 2 TANST : Bohrloch für diese Schraube während OP sehr nah am Beckenkamm gesetzt, Schraube wurde zur Risikominimierung einer Fraktur leicht über den Knochenrand hinaus stehend belassen und nicht komplett eingedreht.

Die Schraube von Schaf 4702, an Position 1, eine Cobalt-Chrom Schraube, war eigentlich auf der linken Beckenseite an Position 10, wurde aber zum Torque-Test ersatzweise herangezogen, weil beim Sägen in die Blöcke der Block von Position 1 rechts keine Schraube enthielt. Diese Situation entstand dadurch, da es durch das Überwachsen mit Knochenmaterial nicht möglich war den Schraubenkopf genau zu lokalisieren und so „blind“ gesägt werden musste und die Schraube selbst offenbar verpasst und aus Versehen mit dem Restknochen weggeworfen wurde; diese Cobalt-Chrom Schraube der rechten Beckenseite ging somit im Zuge der Probenaufbereitung verloren. Die Positionsänderung der „Ersatzschraube“ wurde bei der Auswertung berücksichtigt.

### **3.4 Histologische Auswertung**

#### **3.4.1 Qualitative Beurteilung der histologischen Schnitte**

Aufgrund der Materialhärte von Stahl- und allen Cobalt-Chrom Schrauben musste bei diesen Typen von der üblichen Verfahrensweise abgewichen werden. Statt die Implantate an der Innenlochsäge zu bearbeiten musste in diesen Fällen auf die Exakt-Diamantbandsäge ausgewichen werden. Da diese Säge keinen so genauen Führschlitten wie die Innenlochsäge besitzt, musste die Parallelität des Probblocks für das Sägen mit blossem Auge hergestellt werden. Da dies nicht immer 100% möglich war, wurden einige Präparate nicht ganz korrekt im Längsschnitt getroffen. Des Weiteren wird das Sägen mit der Exakt-Säge von einem hohen Sägeblattverlust begleitet, so dass es in

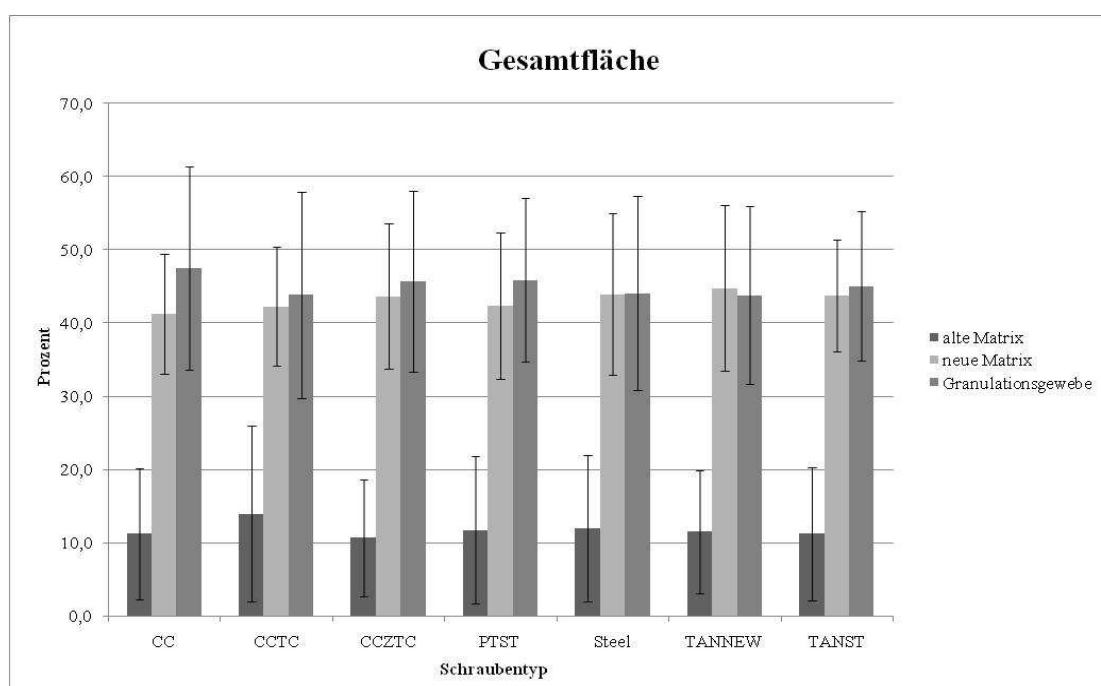
einigen Fällen nicht möglich war einen kompletten Längsschnitt der Schraube im Schnittbild aufzuweisen (Abb.21), bzw. teilweise war ein zweiter Anschnitt des Probestocks überhaupt nicht mehr möglich. Durch den hohen Kraftaufwand, der beim Sägevorgang bei diesen harten Materialien von Nöten war, wurde auch bei mehreren Schnitten die Schraube leicht aus ihrer Knochenverbindung ausgelöst wodurch bei der Auswertung am Mikroskop ein Artefaktsaum am Übergang zum Implantat sichtbar wurde. In einem Fall hatte sich die Schraube komplett ausgelöst (4702 L3 PTST). Bei der Schraube 4704 L3 war die Spitzen der Schraube, auf einer Seite, durch das vorherige Zuschneiden in Blöcke, bereits angesägt. Eine Cobalt-Chrom (4702 R1) (siehe Abschnitt 4.4) Schraube ging leider im Zuge der Probenaufbereitung verloren. Nichts desto trotz konnten auch diese Schnitte ausgewertet werden, weil trotz der Verschiebung oder sogar des Verlustes der Schrauben das in Plastik eingebettete Gewebe vollständig erhalten und damit die BIC mit dem Implantat dennoch rekonstruiert werden konnten.

### **3.4.2 Auswertung der Fluoreszenzschnitte**

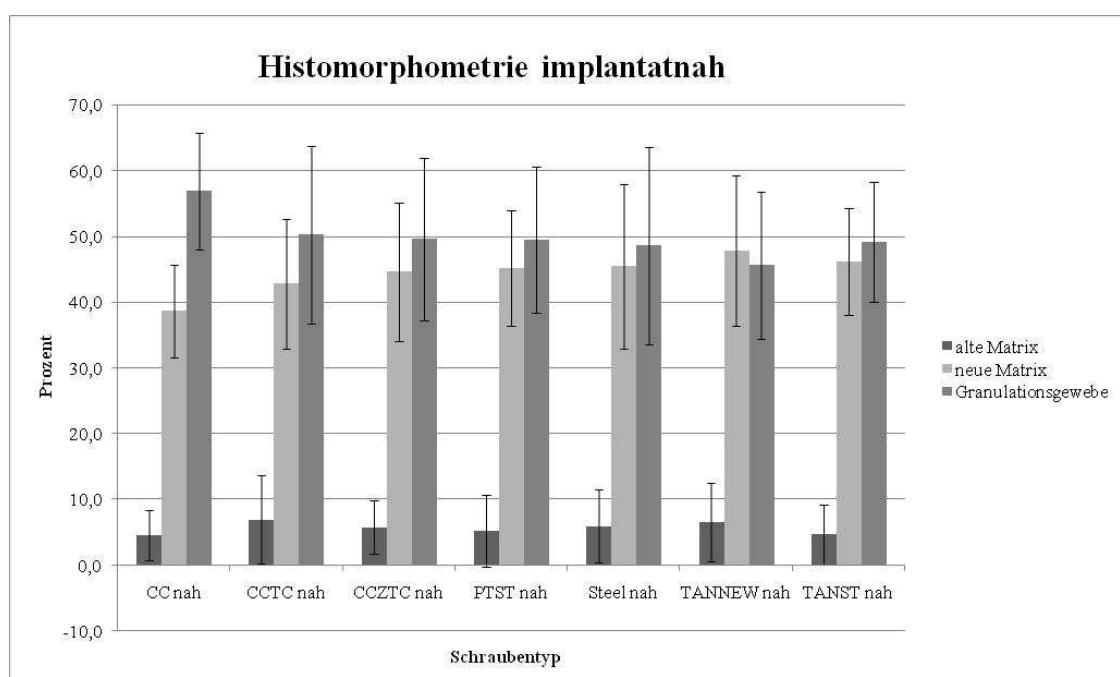
Bei allen Schrauben konnte man eine Fluoreszenzanfärbung über das gesamte Schraubengewinde feststellen. Die Breite der Reaktion war bei den verschiedenen Materialien ähnlich und betrug ungefähr das 1,5-fache der Gewindezahnlänge. Im Cortextbereich fand sich eine stärkere Xylenol-Orange-Färbung, im spongiösen Bereich überwog der Calcein-Grün-Marker. Materialien aus Stahl und Cobalt-Chrom zeigten einen geringeren Anteil an direkten Kontaktflächen des Knochens mit dem Implantat. Die übrigen Schrauben wiesen eine deutliche, scharfe Strukturierung, vor allem auch zwischen den Gewindezähnen, auf (Abb.22 und 23).

### **3.4.3 Histomorphometrische Auswertung der Toluidinblau-Dickschnitte**

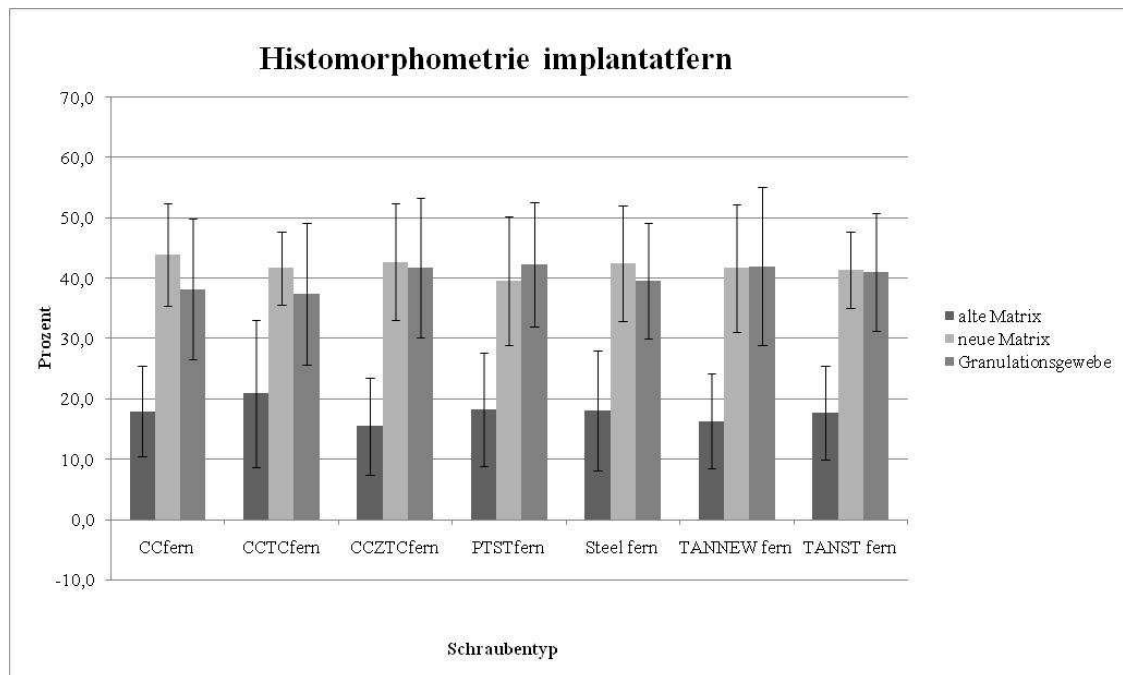
Bei der Auswertung der Fläche der verschiedenen Gewebefractionen (neuer und alter Knochen, Granulationsgewebe) liessen sich im prozentualen Anteil keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Materialkonfigurationen feststellen (Diagr. 2 und Tab.3).

**Diagramm 2 : Histomorphometrie Gewebefractionen in % (Gesamt)**

Implantatnah (Diagr. 3 und Tab.4) konnte im Vergleich zum implantatfernen (Diagr. 4 und Tab.5) Sektor prozentual mehr neue Knochenmatrix (Mittelwert nah: 44,35%  $\pm$ 9,95%; Mittelwert fern: 41,87%  $\pm$ 8,67%) sowie mehr Granulationsgewebe (Mittelwert nah: 49,98%  $\pm$ 11,83%; Mittelwert fern: 40,24%  $\pm$ 11,00%) ermittelt werden. Implantatfern findet sich ein höherer Prozentsatz an alter Knochenmatrix (Mittelwert nah: 5,66%  $\pm$ 5,22; Mittelwert fern: 17,89%  $\pm$ 9,03%)

**Diagramm 3 : Histomorphometrie Gewebefractionen in % *implantatnah***

**Diagramm 4 : Histomorphometrie Gewebefractionen in % *implantatfern***



Von der Auswertung ausgenommen wurden folgende Schrauben:

- 4701 L5 TANNEW : Sägeartefakte
- 4702 L3 TANNEW : gebogen, Rahmen liess sich somit nicht korrekt anlegen
- 4703 L2 PTST : Schraube ausgelöst
- 4703 L3 CCZTC : zu kurz, gebogen
- 4703 L5 Steel : Schraube nur marginal angesägt

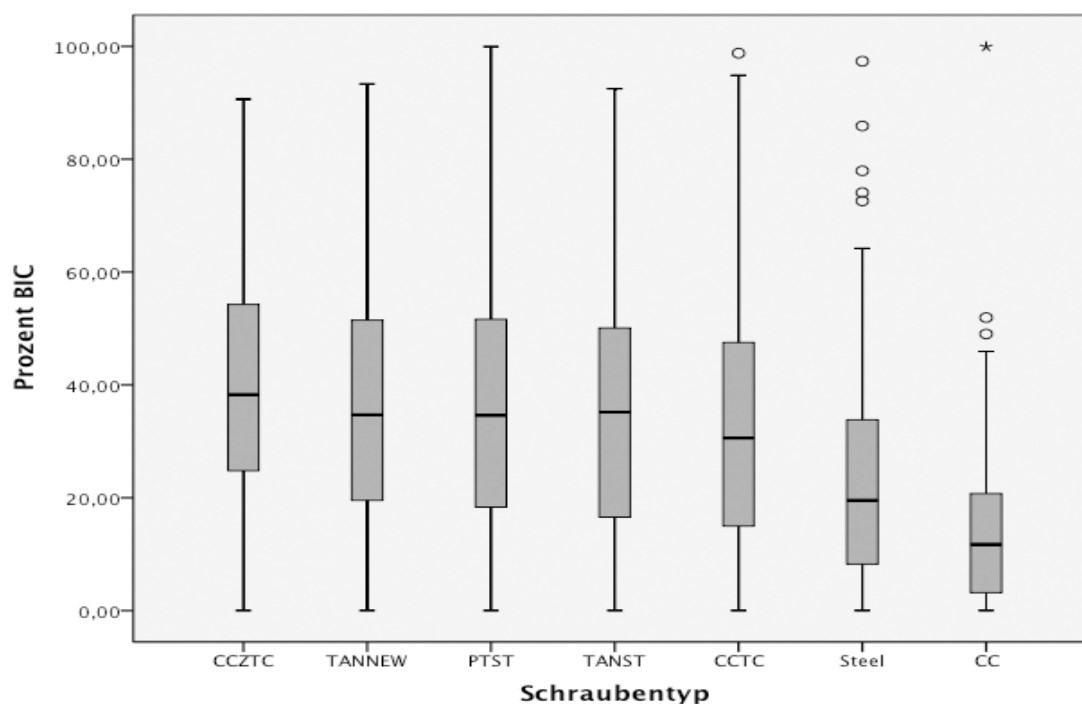
Bei folgenden Schrauben konnte zur Auswertung nur eine Seite herangezogen werden:

- 4704 L3 Steel : Schraubenspitze angesägt
- 4704 L8 CCZTC : gebogen

### 3.4.4 Auswertung des BIC

Stahl- und reine Cobalt-Chrom-Schrauben wiesen signifikant geringere Anteile an Kontaktflächen zum Implantat auf als die übrigen getesteten Materialkonfigurationen. Dabei erzielten Stahl-Schrauben mit einer Signifikanz von  $p = 0.001$  höhere Werte als Cobalt-Chrom und alle übrigen Schrauben wiesen höhere Werte mit einer Signifikanz von  $p < 0.0001$  gegenüber Stahl auf und lagen folglich auch signifikant über den Werten von Cobalt-Chrom.

Mittelwerte, Standardabweichungen und Probenanzahl der untersuchten Schraubentypen sind in der Tabelle 6 sowie in Diagramm 5 dargestellt:

**Diagramm 5: Ergebnisse BIC (Bone-to-Implant-Contact) in %**

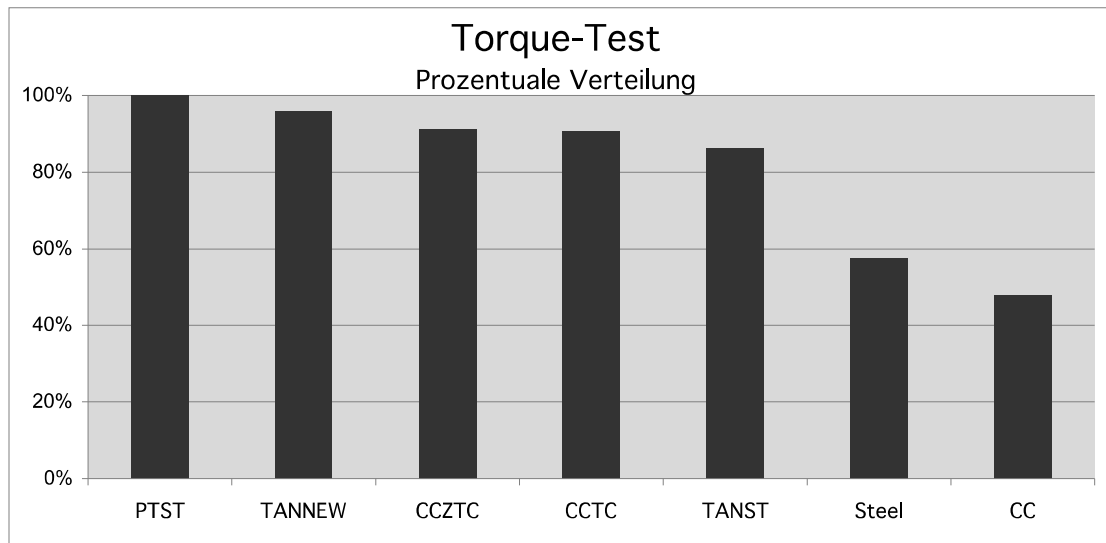
Bei den meisten Schrauben konnten 21-22 Sektoren pro Schraube ausgewertet werden. Niedrigere Probenanzahlen entstanden aus folgenden Gründen:

- CCZTC 4707 L9 : Ein Festziehen während der Operation war nicht möglich, Schraube überdrehte und wurde deswegen für diese Auswertung aussen vor belassen
- CCZTC 4703 L3 : Der Dickschnitt umfasste nur die halbe Schraube, somit fehlten die Sektoren 8-11 sowohl oben als auch unten
- Steel 4703 L5 : Sektor 1-7 oben und unten fehlen
- Steel 4704 L3 : Sektor 9-11 unten nicht auswertbar
- CC 4702 L1 : fehlende Probe

### 3.5 Zusammenfassung der Resultate

CC zeigte von allen Materialkonfigurationen die geringsten Werte des Yield Points bei der Messung im Torque-Test (130,1 Nmm) mit einer Signifikanz von  $p=0.031$  gegenüber Reintitan (270,9 Nmm). Stahl wies eine Tendenz geringerer Werte gegenüber den anderen Werkstoffen auf (exkl. CC und TANST).

**Diagramm 6: Vereinfachte Darstellung Torque-Test**



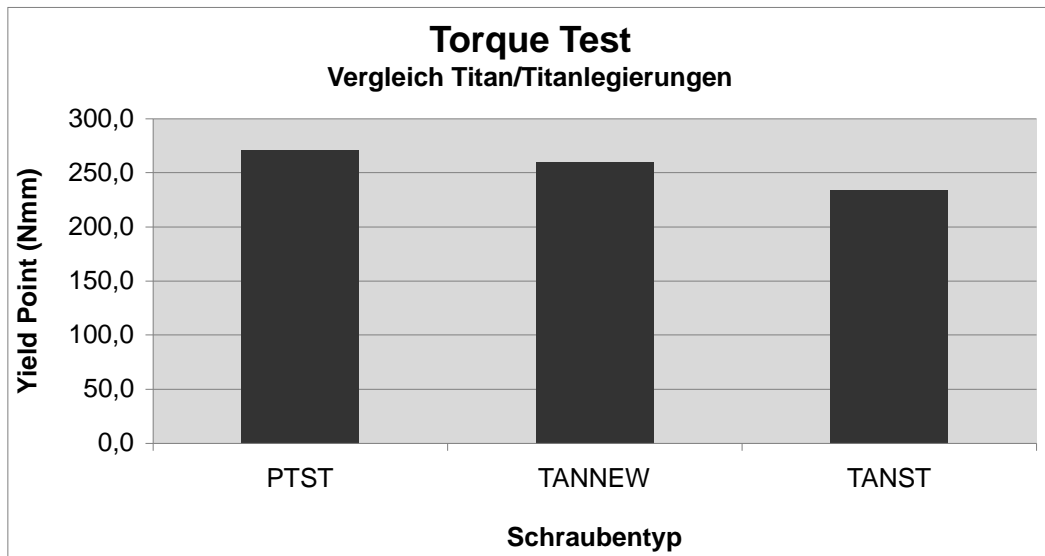
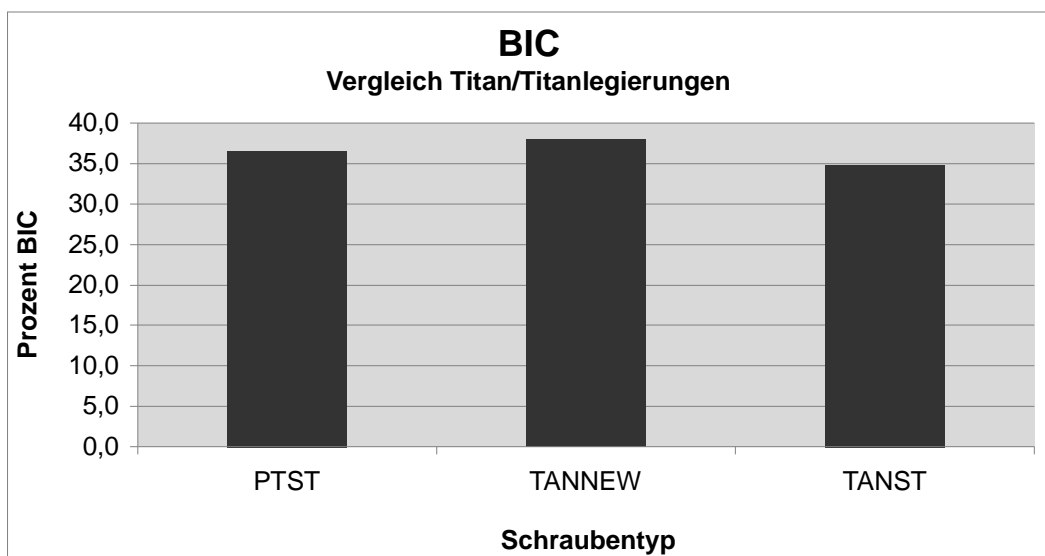
**Anmerkung:** Zur Veranschaulichung wurde PTST= Reintitan als Referenzwert mit 100% festgelegt

In der Histomorphometrie konnten zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bei den Resultaten der BIC-Messungen wies CC einen signifikant geringeren Prozentsatz (14%) an Knochen-Implantat-Kontaktliniengegenüber Stahl (23,2%) auf ( $p=0.001$ ) und dieser war wiederum signifikant geringer als alle übrigen Materialkonfigurationen ( $p=0.0001$ ). Die unterschiedlichen Sektoren zeigten keine signifikanten Unterschiede zueinander.

## 4 Diskussion

Alle getesteten Materialkonfigurationen zeigten eine gute Biokompatibilität, jedoch bei den reinen Cobalt-Chrom- und Stahlschrauben wurden anhand verschiedener Auswertungsverfahren (Torque-Test, Fluoreszenz und Bone-to-Implant-Contact) eine geringere Osseointegration als bei den übrigen getesteten Materialkonfigurationen nachgewiesen. Gleichzeitig konnte jedoch festgestellt werden, dass eine Beschichtung von Cobalt-Chrom mit Zirkonium und/oder Titan die Osseointegration der Implantate erhöht.

Die beiden getesteten Titanlegierungen (TAN Standard und TAN new finish) waren vergleichbar im Osseointegrationsverhalten wie Reintitan.

**Diagramm 7: Torque - Reintitan (PTST)/Titanlegierungen (TANST/TANNEW)****Diagramm 8: BIC - Reintitan (PTST)/Titanlegierungen (TANST/TANNEW)**

#### 4.1 Das Schaf als Modell

Die Wahl des Modells erfolgte nebst den wissenschaftlich zu erwartenden Resultaten auch unter Einbezug von moralischen und ethischen Aspekten. Von der Wissenschaft her gesehen wurde das Beckenmodell gewählt, weil es zum einen leicht zugänglich ist und zum anderen sich in vorherigen Studien bereits als sehr zuverlässig und reproduzierbar hinsichtlich der Daten erwiesen hatte<sup>57-59</sup>. Von der ethischen Seite her konnte das 3R Konzept für Tierversuche in dieser Studie zumindest in zwei von drei Punkten gut berücksichtigt werden:

- **Replace:** Eine Prüfung der Osseointegration und Biokompatibilität von Implantatmaterialien ist nur in einer *in vivo* Studie möglich<sup>60,61</sup>. Insofern konnte hier keine Alternative zu Tierversuchen eingesetzt werden.
- **Reduce:** durch die Möglichkeit insgesamt 18 Proben in ein und demselben Tier zu testen konnte die Versuchstierzahl auf ein Minimum von 7 Tieren reduziert werden. Mit diesem Tiermodell können sowohl inter-, wie auch intra-individuelle Varianzen minimiert und verglichen werden.
- **Refine:** Das Tiermodell ist, wenn richtig ausgeführt, wenig belastend für die Tiere. Der Knochen bleibt intakt und der Zugang zum Becken kann schonend und mit wenig Trauma für die Muskulatur bewältigt werden. So zeigten die Tiere bereits wenige Stunden nach der OP kaum Störungen im Bewegungsablauf und ebenfalls schon kurz nach dem Aufwachen eine unbeeinträchtigte Futter- und Wasseraufnahme. Dazu konnten die Schafe in sozialen Gruppen gehalten werden und sie wurden auch am Tag der Operation viermal analgetisch behandelt. Die Anästhesie sowie die Operation wurden von erfahrenen und qualifizierten Anästhesisten und Chirurgen durchgeführt. Die postoperative Analgesie wurde zudem 3 Tage post operationem fortgeführt und die Tiere unterlagen ständig tierärztlicher Kontrolle.

Das Schaf ist als Versuchsmodell für Knochenstudien geeignet nicht nur, weil es im Handling problemfrei ist und weniger stressanfällig scheint als andere Tierarten, sondern vor allem weil sie eine ähnliche Knochenstruktur wie auch - Metabolismus zeigen wie Menschen<sup>61-63</sup>. Auch die chemische Zusammensetzung des ovinen Knochens ähnelt der des humanen<sup>64,65</sup>. Durch ihre Grösse und ihr Körpergewicht, das etwa dem des erwachsenen Menschen entspricht, eignen sich Schafe für den Einsatz von humanmedizinischen Implantaten. Der entscheidende Vorteil hierbei ist, dass das für humane Operationen vorgesehene Instrumentarium direkt schon im Versuch angewendet werden kann und so späteren chirurgischen und technischen Problemen vorgebeugt werden kann. Gleichzeitig ermöglicht die Grösse, das Testen mehrerer Implantate in einem Tier und reduziert so die Tierzahl<sup>66</sup>. Dennoch ist eine uneingeschränkte Extrapolation auf den Menschen auch mit dieser Spezies nicht



möglich, denn kein Tier entspricht anatomisch, biochemisch, physiologisch und biologisch exakt dem Menschen<sup>66</sup>. Diskrepanzen bestehen auch darin, dass in Tiermodellen gesunde Tiere verwendet werden, wohingegen Patienten in der Orthopädie häufig krank oder bereits in einem fortgeschrittenen Alter sind<sup>64,67</sup>. Diese Umstände haben ebenfalls Einfluss auf die Knochenheilung. Zudem fehlt bei den chirurgischen Tierstudien das bei Frakturen vorausgegangene Trauma, so dass in einer experimentellen Studie, das umliegende Gewebe deutlich unversehrter bleibt als in der „Realität“. Eine Schädigung von Nerven und Blutgefäßen beim Trauma können einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Knochenheilung bewirken<sup>67</sup>. Auch wenn die experimentelle Situation nicht vollständig der realen, klinischen Situation entspricht, so müssen Implantate dennoch vor dem klinischen Einsatz auf ihre Biokompatibilität und ihre Fähigkeit der Osseointegration getestet werden. Dafür eignet sich das Beckenmodell in Schafen ausgezeichnet.

## **4.2 Operationsmethode**

Die Operationsmethode war sehr gut standardisiert, womit sich das Beckenmodell erneut bewährte. Nur bei den Schafen 4702 sowie 4704 wurde ein Bohrloch zu weit kaudal bzw. eines relativ nah am Beckenkamm gesetzt, was aber in der Interpretation der Daten berücksichtigt wurde. Die Schablone muss so fixiert werden, dass sie nicht von der optimalen Positionierung abweichen kann, bzw. sorgfältige visuelle Kontrolle der Abstände der Bohrlöcher sowie deren Platzierung ist trotz der Schablone unabdingbar.

Das Bohrloch der Schrauben lässt sich mit einer gewöhnlichen Knochenverletzung vergleichen<sup>8</sup>. Es wurden absichtlich keine selbstschneidenden Schrauben gewählt, um einen möglichen zusätzlichen Einfluss auf die Osseointegration so gering als nur möglich zu halten. Aus diesem Grund wurde auch das Beckenmodell gewählt, bei dem die Implantate einzig der biomechanischen Belastung durch die Glutealmuskulatur ausgesetzt sind und somit die Hauptfragestellung, nämlich der Biokompatibilität und damit zusammenhängenden Osseointegration, nicht noch durch zusätzliche Einflüsse wie Frakturlinien, Instabilität etc., gestört werden konnte. Dies muss dann jedoch bei der Extrapolation auf den Menschen, bzw. einer klinischen Situation berücksichtigt werden. Eine transcorticale Platzierung der Implantate im Becken ist von klinischer Relevanz, da die Implantate auch im humanmedizinischen Einsatz mit hoher

Wahrscheinlichkeit gleichzeitig sowohl im corticalen als auch im spongiösen Knochengewebe eingesetzt werden<sup>68</sup>.

### **4.3 Probengewinnung und –aufbereitung**

Der Zeitraum bis zur Schlachtung der Tiere wurde mit 8 Wochen bewusst gesetzt, da in dieser Zeit die erste Wundheilungsphase und diejenige des Bone Remodellings im Knochen von Schafen zum grössten Teil abgeschlossen sind. Resorption von alter, nekrotischer Knochenmatrix (z.B. Knochendebris) dauert ca. 2 Wochen, die Differenzierung der Knochenzellen kann 4-5 Wochen anhalten und nach bereits 4 Monaten hat der Knochen grösstenteils wieder zu seiner ursprünglichen Form zurückgefunden<sup>5</sup>, sofern Kontaktheilung möglich war.

Als schwierig gestaltete sich im Zuge der Probenaufbereitung das Zusägen der Proben für die Histologieschnitte. Lediglich die Titan und TAN- Schrauben liessen sich mit der Innenlochsäge bearbeiten. Für die übrigen Materialien musste aufgrund der Materialhärte auf die Bandsäge „Exakt“ ausgewichen werden. Diese Verfahrensweise bleibt verbesserungswürdig, da ein exakter Schnitt durch die Längsachse angestrebt wird und dieser mittels dieser Bandsäge nicht immer realisiert werden konnte aufgrund einer fehlenden, standardisierten, parallel verlaufenden Anbringungs Vorrichtung für die Knochenblöcke. Leider gibt es zur Zeit noch keine modernere, oder genauere Knochensäge auf dem Markt, und die individuelle Aufrüstung mit der entsprechenden Technologie unserer Säge war zum Zeitpunkt der Studie noch nicht fertig gestellt (Investitionskredit, Universität Zürich, 2009).

Auch das Auslösen einiger Schrauben aus der Knochenverbindung muss unter diesem Aspekt berücksichtigt werden und der fehlende Knochen-Metallkontakt darf bei der Auswertung nicht fälschlicherweise als Granulationsgewebe interpretiert werden. Dies liess sich jedoch anhand einer klar abgezeichneten Demarkationslinie am Gewebe, die mit der Aussenlinie des Implantates übereinstimmte, relativ gut abgrenzen.

### **4.4 Removal-Torque-Test**

Die niedrigeren Ausdrehwerte in den cranialen Positionen des Beckens lassen sich durch das etwas weichere Knochengewebe und einer etwas dünneren Kortex in diesem Bereich erklären. Die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant und dürften auch der biologischen Variabilität entsprechen, wie sie in der Klinik bei normalen Patienten vorgefunden wird.

Einen Einfluss auf die Resultate besitzt die Oberflächenbeschaffenheit der Schrauben. Nach einer Studie zur Messung der Rauigkeit der verschiedenen angewendeten Materialkonfigurationen<sup>69</sup> (Report RMS Stiftung) weisen TANST und PTST die höchste Rauigkeit auf ( $\varnothing$  Rauigkeit von ca.  $0.32\mu\text{m}$ ), TANNEW zeigt eine intermediäre Rauigkeit auf ( $\varnothing$  Rauigkeit von ca.  $0.28\mu\text{m}$ ), Stahl und die CC-Schrauben zeigen eine glatte Oberfläche entlang des Gewindegrundes ( $\varnothing$  Rauigkeit von ca.  $0.22\mu\text{m}$ ); senkrecht zum Gewinde weist lediglich Stahl eine glatte Oberfläche auf, somit lässt sich eine positive Korrelation zu niedrigen Ausdrehwerten nur bei Stahl festhalten.

In einer *in vivo* Studie von Hayes und Richards<sup>70</sup> konnte gezeigt werden, dass durch das Polieren von Reintitan ( $\varnothing$  Rauigkeit von  $0.09\mu\text{m}$ ) und TAN ( $\varnothing$  Rauigkeit von  $0.27\mu\text{m}$ ) niedrigere Ausdrehwerte beim Torque-Removal-Test von Nöten waren als bei den standardisierten mikrorauen Schrauben. Dies zeigte sich bei der Platzierung der Schrauben in Spongiosa von Schafen. Bei corticaler Platzierung zeigte nur das polierte Titan einen signifikant niedrigeren Ausdrehwert, TAN zeigte jedoch nach 12 und 18 Wochen weiterhin einen Trend zu niedrigeren Ausdrehwerten.

Stahl zeigt in der von uns durchgeführten Studie einen signifikant geringeren Ausdrehwert als Reintitan, bei reinem CC lassen sich Tendenzen feststellen. Da dies auch die beiden Schraubenmaterialkonfigurationen mit der geringsten Rauigkeit entlang des Gewindegrundes sind ist eine Vermutung über einen Zusammenhang mit der Oberflächentopographie durchaus zulässig. Zu beachten ist, dass die Schrauben in dieser Studie gleichzeitig im corticalen als auch im spongiösen Knochen verankert waren.

In einer weiteren *in vitro* Studie von Hayes<sup>71</sup> konnte ein Zusammenhang zwischen der Oberflächentopographie der Materialkonfigurationen und Osteblastendifferenzierung sowie Zellmorphologie aufgewiesen werden. Elektropoliertes Titan wies eine geringere Expression von Osteocalcin auf als das Standard mikrorauere Titan. Es wird angenommen, dass vermindertes Osteocalcin die endgültige Differenzierung von Zellkulturen auf polierten Titanimplantaten verzögert. Auch Knochen-Sialoprotein, welches Osteoblastendifferenzierung und Matrixmineralisation unterstützt, wurde signifikant reduziert bei poliertem Titan gefunden. Somit konnte in dieser Studie von Hayes die Hypothese aufgestellt werden, dass endgültige Zelldifferenzierung bei polierten Oberflächen später stattfindet als bei mikrorauen Oberflächen und somit die Osseointegration verzögert. Auch die unterschiedliche Zellmorphologie gibt Hinweise auf den Zusammenhang zwischen Oberflächenstruktur und Osseointegration. Bei

polierten Oberflächen wiesen die Zellen ein eher Fibroblasten-ähnliches Aussehen auf. Die Zellen auf mikrorauen Oberflächen zeigten eine Osteoblasten-typische kubische Form und durch diese Form eine begrenzte Zellausbreitung zwischen den Oberflächenstrukturen mit fokaler Adhäsion.

Es bleibt jedoch darauf zu verweisen, dass die Oberflächentopographie nicht der einzige Faktor ist, der Einfluss auf die biologische Antwort eines Organismus hat, wenn dieser in Kontakt mit einem Implantatmaterial tritt<sup>54</sup>. Die grosse Mehrheit der kommerziell verfügbaren Implantate besitzt eine moderate Oberflächen-Rauigkeit<sup>17</sup>. Speziell Osteosyntheseimplantate sind in der Rauigkeit der Oberfläche limitiert da diese Implantate nach abgeschlossener Knochenheilung wieder entfernt werden müssen. Bei zu rauer Oberfläche würde die Rückgewinnung der Implantate sonst chirurgische Probleme bereiten<sup>7</sup>. Des Öfteren müssen Implantate auch vorzeitig entfernt werden, aufgrund von Komplikationen wie Infektionen, allergischen Reaktionen, Implantatversagen, *etc.*. Dabei ist es manchmal nicht möglich das Implantat komplett zu entfernen. Schwierigkeiten bei der Explantation der Implantate führen zu verlängerter Operationsdauer, folglich längerer Anästhesiebelastung, einhergehend mit erhöhten Blutverlusten, Kontamination mit Abriebteilchen und einer potentiellen Refrakturierung<sup>72,73</sup>.

Beim Menschen lässt sich eine Proportionalität zwischen den Torque Werten und der Scherfestigkeit an den Grenzflächen festmachen. Die Scherfestigkeit des Knochens ist jedoch im humanen Knochen höher, wenn sie entlang der Längsachse gemessen wird, und verringert sich mit der Änderung der Achse<sup>74</sup>. Auch dies ist bei der Auswertung des Schafmodells zu beachten, da das Beckenmodell eine andere Achsenausrichtung bietet als humane Röhrenknochen. Demzufolge könnten die Schrauben in einer humanen klinischen Studie eventuell höhere Werte erzielen.

Bereits in einer früheren Studie von Olmstead und Pohler erzielten Reintitan und Titanlegierungen im direkten Vergleich miteinander bei der biomechanischen Testung im Hundefemur ähnliche Torquewerte<sup>75</sup>. Reintitan zeigte zwar eine Tendenz zu den höchsten Ausdrehwerten, jedoch waren die Unterschiede zu den Werten der Titanlegierung nicht signifikant. Eine deutliche Tendenz zu höheren Ausdrehwerten liess sich hingegen durch eine Beschichtung von Cobalt-Chrom Schrauben im Vergleich zur reinen Cobalt-Chrom Schraube festmachen. Dies lässt vermuten, dass durch die Beschichtung mit Titan und Zirkonium auch deren gute Biokompatibilität mit auf das Implantat übertragen wurde. Pearce et al. verglichen ebenfalls in einer Studie

am Schaf, allerdings an der Tibia, die Ausdrehwerte von zusätzlich elektropoliertem Titan, TAN mit den mikrorauen gebräuchlichen Varianten und mit Stahl. Elektropoliertes TAN zeigte eine Tendenz zu niedrigeren Torquewerten als Standard-TAN, jedoch auch da konnte keine statistische Signifikanz beobachtet werden<sup>72</sup>. In der vorliegenden Studie waren die Werte für TANST etwas geringer als für das zusätzlich polierte TANNEW. Dieses wiederum erfuhr jedoch auch eine grössere Standardabweichung, so dass auch hier keine signifikanten Differenzen gezeigt werden konnten. Stahl zeigte in der Studie von Pearce et al. signifikant niedrigere Werte als elektropoliertes TAN. Dies deckt sich mit den Befunden aus der vorliegenden Beckenmodellstudie, wobei hier jedoch lediglich eine Tendenz geringerer Werte festzumachen war. Auch Christensen et al konnten in einer Studie an Minipigs signifikant geringere Torquewerte für Stahl im Vergleich zur Titanlegierung TAV festhalten<sup>38</sup>. Ob dieser Unterschied an Signifikanzen letztlich am Knochen (Becken vs. Tibia), an der Spezies (Schaf vs. Minipig) oder am die Tests durchführenden Labor und deren speziellem Testmaschinenaufbau lag, ist unbekannt und kann nicht abschliessend beantwortet werden.

#### **4.5 Fluoreszenz**

Anhand der Fluoreszenzfärbung liess sich verdeutlichen, dass das Remodelling bei allen Materialgruppen im Cortextbereich später stattfindet, da sich hier eine stärkere Xylenol-Orange-Färbung abzeichnet. Das Remodelling in der Spongiosa scheint bereits mit 4 Wochen abgeschlossen zu sein, da hier am Kontaktpunkt mit dem Implantat der Calcein-Grün-Marker überwiegt. Dies lässt sich durch den Umstand erklären, dass im Cortex erst alter, nekrotischer Knochen resorbiert werden muss bevor neuer aufgebaut werden kann, wohingegen das Remodelling in der Spongiosa sofort stattfinden kann. Spongiöser Knochen besitzt eine grössere Oberfläche, welche wiederum durchsetzt ist von Knochenmark. Im Knochenmark finden sich viele mesenchymale Vorläuferzellen. Zudem ist das Mark stark durchblutet und kann sowohl Vorläufer für Osteoklasten, als auch Endothelzellen für die Angiogenese bereitstellen. All diese Umstände fördern die schnellere Umbaurate im trabekulären Knochen<sup>12</sup>.

Die deutliche Strukturierung sowie ein gleichmässig erhöhter Xylenolorangeanteil bei CCTC, CCZTC, PTST, TANNEW, TANST lassen eine positive Korrelation zu höheren Ausdrehwerten im Torque Test vermuten. Die deutlichen, die Gewindezähne ausfüllenden Konturierungen lassen auf einen erhöhten Knochenkontaktanteil zum

Implantat schliessen, der das Osseointegrationsvermögen steigert. Durch einen gleichmässig über das Implantat verteilten Anteil an Xylenolfluoreszenz erscheint das Prinzip der Verankerung des Implantates besser gewährleistet zu sein als bei ungleicher Verteilung der Knochenremodellierung an Kopf und Spitze der Schraube.

### 4.6 Histomorphometrie

Implantatnah konnte prozentual mehr neue Knochenmatrix festgestellt werden als implantatfern, was sich durch die Gewebeverletzung implantatnah erklären lässt. Der implantatferne Bereich wurde beim Einbringen der Schrauben nicht in Mitleidenschaft gezogen und weist folglich einen höheren Prozentsatz an alter Knochenmatrix auf.

Da keine signifikanten Unterschiede in der Fläche der verschiedenen Gewebefractionen zwischen den einzelnen Materialien festgestellt wurden darf angenommen werden, dass der Anteil der Gewebefraktion nicht allein ausschlaggebend für die Stabilität der Verankerung des Implantates ist. Eine solche Entwicklung ist wünschenswert, da der Knochenmetabolismus (Resorption, Aufbau und Remodelling) durch die Implantate möglichst nicht gestört werden soll. Die Ergebnisse unserer Studie decken sich mit einer vergleichenden Studie von CoCr und Titanimplantaten von Jakobsen et al., wo im Hundemodell histomorphometrisch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden konnten bei gleichzeitig signifikanten Unterschieden in der biomechanischen Testung<sup>76</sup>. Auch in der Minipig Studie von Christensen et al. ergab das Knochenvolumen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Titanlegierung TAV und Stahl<sup>38</sup>. Aus diesem Grund wird auch durch ihre Studie davon ausgegangen, dass der Kontaktanteil die Menge des Knochenvolumens nicht verändert.

### 4.7 BIC

Im Gegensatz zu der Knochenfläche in der anliegenden Zone ist davon auszugehen, dass ein höherer Anteil an Kontaktfläche des Knochens zum Implantat eine stärkere Osseointegration bewirkt, da ein erhöhter prozentualer Anteil des BICs mit höheren Torque-Ausdrehwerten korreliert. Diese Beobachtungen wurden bereits in vorangegangenen Studien gemacht und konnten nun erneut bestätigt werden<sup>38,77</sup>. Der Kontakt wird durch reifen Lamellärknochen hergestellt, der sich an die Oberfläche der Implantate heftet. Lamellärer Knochen ist wachstumsfähig und unterliegt einer hohen Remodellierungsrate<sup>6</sup>. Deckend mit der Studie von Pearce et al. (08) wies Stahl einen signifikant geringeren BIC auf als die elektropolierte Titanlegierung. Auch Christensen et al. konnte einen signifikant höheren Knochenkontaktanteil zum Implantat bei einer

Titanlegierung im Vergleich zu Stahl festhalten<sup>38</sup>. Zwischen mikrorauem TANST und elektropolierten TANNEW konnten hingegen in dieser Studie keine Unterschiede gefunden werden. Auch in der Studie von Pearce et al. hatte die Oberflächenbearbeitung keinen Effekt auf den Anteil der Kontaktfläche. Die Ergebnisse von Pearce et al. zeigten, dass das Polieren einer Oberfläche zwar niedrigere Torque-Ausdrehwerte erzielt, aber auch in ihrer Studie konnten die Unterschiede nicht mit signifikanten Unterschieden belegt werden. Auch in der Studie von Hayes et al. konnte bei elektropolierten TAN Schrauben keine Signifikanz in den BIC Werten, vergleichend mit Standard TAN Schrauben ausgemacht werden. Allerdings gestaltete sich bei Hayes et al *ex vivo* das Entfernen von Weichteilgewebe von verriegelten Platten/Schrauben Systemen deutlich leichter bei polierten Implantaten. Aus diesem Grund kamen die Autoren zum Schluss, dass das Polieren die Entfernung von Implantaten erleichtert, während die Biokompatibilität und die Implantatstabilität weiterhin gewahrt bleiben<sup>73</sup>. In der vorliegenden Beckenstudie wurden lediglich Schrauben ohne Verplattung getestet. Das Entfernen des Gewebes von den Schraubenköpfen liess keinen aussagekräftigen Rückschluss zu, da keine Unterschiede in der Schwierigkeit der Gewebeablösung anhand der Materialien festgestellt werden konnten.

In einer *in vitro* Studie konnte gezeigt werden, dass Osteoblasten auf Titan schneller wachsen als auf Cobalt-Chrom<sup>78</sup>. Dies wäre eine Erklärung für die insgesamt höheren BIC-Werte von Titan im Vergleich zu Cobalt-Chrom, wobei eine direkte Schlussfolgerung auf die *in vivo* Situation mit Vorsicht betrachtet werden muss. Zu beachten bleibt, dass bei der Auswertung des BIC's jeweils nur eine Schnittebene der Schraube herangezogen wurde und von dieser Ebene auf die gesamte Schraube geschlossen wurde. Somit liegt kein dreidimensionales Messverfahren vor, was die BIC Werte noch leicht verändert haben könnte. Eine 3D Auswertung wäre lediglich mit einer  $\mu$ CT Technik möglich, die jedoch aufgrund der Metallimplantate zu viele Artefakte aufgewiesen und eine sorgfältige Auswertung der BIC Werte verhindert hätte. Die Auswertung in der Histologie erlaubt lediglich eine 2D Evaluation, wobei diese an mehreren Schnitten hätte durchgeführt werden können. Eine vergleichende Auswertung von einer zweiten Schnittebene war durch den hohen Sägeblattverlust bei diesen relativ kleinen Implantaten nicht möglich, es lässt sich somit keine abschliessende Aussage darüber machen, ob dies einen Einfluss auf die Ergebnisse ausgemacht hätte. Da in den meisten Fällen in der vorliegenden Studie alle Schraubengewinde ausgewertet wurden, konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Werte innerhalb der einzelnen

Implantatgruppen recht konstant waren. Es darf ohne weiteres deshalb angenommen werden, dass eine 3D Auswertung der BIC den Mittelwert der einzelnen Gruppen nicht wesentlich verändert hätte.

### **4.8 Biokompatibilität**

In der histologischen Auswertung konnten keine Zeichen von Entzündungsreaktionen und/oder Osteolyse festgestellt werden. Es bleibt jedoch zu beachten, dass die Implantate lediglich über einen Zeitraum von 8 Wochen getestet wurden. Dieser Zeitraum betrifft vor allem die Phase der Wundheilung, bzw. der Abstossung eines unverträglichen Fremdmaterials. D.h. für eine gute Osseointegration ist das die entscheidende Phase. Es darf aber nicht vergessen werden, dass mögliche Entzündungsreaktionen sich beim Menschen auch erst nach geraumer Zeit, abhängig vom Verschleiss des eingesetzten Produktes, entwickeln können. Da Verschleiss gehäuft an Stellen erhöhter Belastung durch Mikrobewegungen auftritt und in dieser Studie Schrauben ohne „Gegenspieler“, wie z.B. einer Osteosyntheseplatte, eingesetzt wurden, muss dieser Aspekt in der klinischen Anwendung im Auge behalten werden.

Zusätzlich bleibt auch zu beachten, dass die Gewebereaktion nicht nur von den Materialien abhängt sondern auch von der jeweiligen Oberfläche des zu testenden Implantats. So erlauben sehr glatte Oberflächen noch Minimalbewegungen, die eine Füllung mit Flüssigkeit im Spalt zulassen, während raue Oberflächen diese Bewegungen stabilisieren und so eine Flüssigkeitsfüllung im Interfacebereich verhindern<sup>7</sup>.

### **4.9 Schlussfolgerung und Perspektiven**

Alle getesteten Materialkonfigurationen zeigten sich biokompatibel, entzündliche Reaktionen blieben aus. Bereits 1951 wurden Titanschrauben auf ihr Osseointegrationsverhalten im Rattenfemur getestet. Dabei waren die Schrauben nach 16 Wochen so stark eingewachsen, dass eine der Femurproben beim Versuch der Entnahme der Schraube frakturierte. Aus diesem Grund wurde schon damals festgehalten, dass Titanimplantate, trotz ihrer ausgezeichneten Biokompatibilität, für den Einsatz als temporäre Implantate weniger geeignet sind<sup>79</sup>. Auch heute noch haben Chirurgen häufig Probleme bei der Explantation von temporären Titanimplantaten. Eine Alternative zu Titan um Komplikationen bei der Entfernung von Implantaten vorzubeugen wäre Cobalt-Chrom als Werkstoff für temporäre Implantate einzusetzen. Cobalt-Chrom zeigte einen zum Titan signifikant geringeren Ausdrehwert als auch



einen signifikant geringeren BIC gegenüber den übrigen getesteten Materialkonfigurationen bei gleich bleibendem Volumenanteil an neuer Knochenmatrix. Was für Langzeitimplantate (z.B. Hüft- oder Knieprothesen) ein Nachteil ist, könnte somit für Kurzzeitimplantate als Vorteil genutzt werden, vor allem wenn eine erhöhte mechanische Belastung und damit Festigkeit des Implantates, oder Beständigkeit gegen Fretting-Korrosion notwendig ist.

Ähnliche Ergebnisse wie Titan konnten Cobalt-Chrom Schrauben erzielen, die mit Titan bzw. mit Zirkonium und Titan beschichtet waren. Die Beschichtung erhöht somit die Osseointegration. In Fällen von Langzeitimplantaten, wo eine hohe Verschleissbeständigkeit und hohe Ermüdungsfestigkeit gefordert sind, wären beschichtete Cobalt-Chrom Implantate somit eine gute Alternative zu den herkömmlichen Titanimplantaten. Die getesteten Titanlegierungen TANST und TANNEW wiesen in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zum Reintitan auf. Hayes et al. konnten jedoch zeigen, dass allein das Polieren die Entfernung des Weichteilgewebes vom Implantat erleichtert. Somit könnte sich das TANNEW Implantatmaterial, das zusätzlich elektropoliert wurde, als Alternative anbieten für Implantate, deren Entfernung nach relativ kurzer Zeit vorgesehen ist (Traumatologie).

Die getesteten Materialkonfigurationen wurden jeweils individuell bewertet und standen nicht in Kontakt zu anderen Materialien. Somit kam es zu keinerlei Korrosionen. Sollten die verschiedenen Materialien kombiniert werden, so müsste dies in einer starren, fixen Verbindung erfolgen um Korrosion zu verhindern. Hierfür wären weitere Studien notwendig um eine mögliche galvanische Korrosion bei Kombination verschiedener Metalle auszuschliessen. Des Weiteren fand die Evaluation in der vorliegenden Studie zu einem definierten Zeitpunkt, d.h. mit 8 Wochen relativ kurzfristig, statt und lässt somit keine Rückschlüsse auf eine Langzeitentwicklung zu. Auch hierfür wären zusätzliche klinische Studien von Nöten. Als weitere Ebene dieser Studie würde sich ein Frakturmodell anbieten um die Materialkonfigurationen unter Belastung und evtl. mit einem Gegenspieler aus einem abweichenden Material zu beurteilen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Albrektsson T, Berglundh T, Lindhe J: Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 4th edition:809-820, 2003.
2. LeGeros RZ, Craig RG: Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. J Bone Miner Res 8 Suppl 2:S583-596, 1993.
3. Puleo DA, Nanci A: Understanding and controlling the bone-implant interface. Biomaterials 20:2311-2321, 1999.
4. STANFORD SCM: Surface modification of biomedical and dental implants and the processes of inflammation, wound healing and bone formation. Int J Mol Sci 2010 Jan 25;11(1):354-69, 2010.
5. Hadjidakis DJ, Androulakis, II: Bone remodeling. Ann N Y Acad Sci 1092:385-396, 2006.
6. Schenk RK, Buser D: Osseointegration: a reality. Periodontology 2000 17:22-35, 1998.
7. Pohler OE: Unalloyed titanium for implants in bone surgery. Injury 31 Suppl 4:7-13, 2000.
8. Marco F, Milena F, Gianluca G, et al: Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. Micron 36:630-644, 2005.
9. Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J, et al: Biology of implant osseointegration. J Musculoskelet Neuronal Interact 9:61-71, 2009.
10. Voggenreiter G: Knochenheilung. Perioperative Medizin 1:86-96, 2009.
11. Chappard D, Aguado E, Hure G, et al: The early remodeling phases around titanium implants: a histomorphometric assessment of bone quality in a 3- and 6-month study in sheep. Int J Oral Maxillofac Implants 14:189-196, 1999.
12. Davies JE: Understanding peri-implant endosseous healing. J Dent Educ 67:932-949, 2003.
13. Niinomi M: Recent Metallic Materials for Biomedical Applications. Metallurgical and Materials Transactions A 33A:477-486, 2001.
14. Ratner H, Schoen, Lemons: Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine, Elsevier Academic Press, 2004.
15. R.Thull: Werkstoffe von Implantaten im Bewegungsapparat. Orthopädie und Unfallchirurgie up2date 4:35-48, 2009.
16. Navarro M, Michiardi A, Castano O, et al: Biomaterials in orthopaedics. J R Soc Interface 5:1137-1158, 2008.
17. Albrektsson T: Hard tissue implant interface. Aust Dent J 53 Suppl 1:S34-38, 2008.
18. Fini M, Giardino R, Borsari V, et al: In vitro behaviour of osteoblasts cultured on orthopaedic biomaterials with different surface roughness, uncoated and fluorohydroxyapatite-coated, relative to the in vivo osteointegration rate. Int J Artif Organs 26:520-528, 2003.
19. Gotman I: Characteristics of metals used in implants. J Endourol 11:383-389, 1997.

20. Ha S-W, Wintermantel E: Medizintechnik - Life Science Engineering (ed 4), Springer, 2008.
21. Gasser E, Frenk: Metallische Implantatwerkstoffe: ...über Anforderungen und Implantatstahl. OP-Journal RMS 16, 2000.
22. Niinomi M. HT, Narushima T. : Japanese Research and Development in Metallic Biomedical, Dental and Healthcare Materials. JOM 57:18–24, 2005.
23. Marti A: Cobalt-base alloys used in bone surgery. Injury 31 Suppl 4:18-21, 2000.
24. Biehl V, Breme J: Metallic Biomaterials. Mat-wiss u Werkstofftech 32:137-141, 2001.
25. Niinomi M: Metallic biomaterials. J Artif Organs 11:105-110, 2008.
26. Disegi JA, Eschbach L: Stainless steel in bone surgery. Injury 31 Suppl 4:2-6, 2000.
27. Simon JP, Fabry G: An overview of implant materials. Acta Orthop Belg 57:1-5, 1991.
28. Disegi J: Magnetic resonance imaging of AO/ASIF stainless steel and titanium implants. Injury 23:S1-4, 1992.
29. Bensmann G: An attempt to asses material suitability taking the example of hip endoprostheses. Materialwissenschaften und Werkstofftechnik 30:733-745, 1999.
30. Marti A., Gasser B.: Metallische Implantatwerkstoffe...über Kobaltbasislegierungen, die Festigkeit und die Verschleissproblematik. OP-Journal RMS 16, 2000.
31. Weinstein AM: Concise encyclopedia of medical and dental materials. Oxford, Pergamon Press, 1990.
32. Jakobsen SS, Danscher G, Stoltenberg M, et al: Cobalt-chromium-molybdenum alloy causes metal accumulation and metallothionein up-regulation in rat liver and kidney. Basic Clin Pharmacol Toxicol 101:441-446, 2007.
33. Allen MJ, Myer BJ, Millett PJ, et al: The effects of particulate cobalt, chromium and cobalt-chromium alloy on human osteoblast-like cells in vitro. J Bone Joint Surg Br 79:475-482, 1997.
34. Bauer TW, Schils J: The pathology of total joint arthroplasty.II. Mechanisms of implant failure. Skeletal Radiol 28:483-497, 1999.
35. Keegan GM, Learmonth ID, Case CP: A systematic comparison of the actual, potential, and theoretical health effects of cobalt and chromium exposures from industry and surgical implants. Crit Rev Toxicol 38:645-674, 2008.
36. Gasser B., Eschbach L., Frenk A.: Metallische Implantatwerkstoffe: Reintitan und Titanlegierungen. OP-Journal RMS 16, 2000.
37. Breme J, Eisenbarth E, Biehl V, et al: Titanlegierungen in der Medizintechnik. In: Titan und Titanlegierungen. Weinheim, Wiley-VCH, 2002.
38. Christensen FB, Dalstra M, Sejling F, et al: Titanium-alloy enhances bone-pedicle screw fixation: mechanical and histomorphometrical results of titanium-alloy versus stainless steel. Eur Spine J 9:97-103, 2000.

39. Disegi J: Titanium - 6% Aluminium - 7% Niobium Implant Material. AO ASIF, 1993.
40. Kumar R, Lerski RA, Gandy S, et al: Safety of orthopedic implants in magnetic resonance imaging: an experimental verification. *J Orthop Res* 24:1799-1802, 2006.
41. Disegi JA: Titanium alloys for fracture fixation implants. *Injury* 31 Suppl 4:14-17, 2000.
42. Thompson GJ, Puleo DA: Ti-6Al-4V ion solution inhibition of osteogenic cell phenotype as a function of differentiation timecourse in vitro. *Biomaterials* 17:1949-1954, 1996.
43. Daley B, Doherty AT, Fairman B, et al: Wear debris from hip or knee replacements causes chromosomal damage in human cells in tissue culture. *J Bone Joint Surg Br* 86:598-606, 2004.
44. Shapira L, Klinger A, Tadir A, et al: Effect of a niobium-containing titanium alloy on osteoblast behavior in culture. *Clin Oral Implants Res* 20:578-582, 2009.
45. Cortizo AM, Bruzzone L, Molinuevo S, et al: A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. *Toxicology* 147:89-99, 2000.
46. Osathanon T, Bessinyowong K, Arksornnukit M, et al: Ti-6Al-7Nb promotes cell spreading and fibronectin and osteopontin synthesis in osteoblast-like cells. *J Mater Sci Mater Med* 17:619-625, 2006.
47. Kobayashi E, Wang TJ, Doi H, et al: Mechanical properties and corrosion resistance of Ti-6Al-7Nb alloy dental castings. *J Mater Sci Mater Med* 9:567-574, 1998.
48. Thomsen P, Larsson C, Ericson LE, et al: Structure of the interface between rabbit cortical bone and implants of gold, zirconium and titanium. *J Mater Sci Mater Med* 8:653-665, 1997.
49. Chevalier J: What future for zirconia as a biomaterial? *Biomaterials* 27:535-543, 2006.
50. Rocchietta I, Fontana F, Addis A, et al: Surface-modified zirconia implants: tissue response in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 20:844-850, 2009.
51. Hoffmann O, Angelov N, Gallez F, et al: The zirconia implant-bone interface: a preliminary histologic evaluation in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 23:691-695, 2008.
52. Schultze-Mosgau S, Schliephake H, Radespiel-Troger M, et al: Osseointegration of endodontic endosseous cones: zirconium oxide vs titanium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 89:91-98, 2000.
53. Scarano A, Di Carlo F, Quaranta M, et al: Bone response to zirconia ceramic implants: an experimental study in rabbits. *J Oral Implantol* 29:8-12, 2003.
54. Depprich R, Zipprich H, Ommerborn M, et al: Osseointegration of zirconia implants compared with titanium: an in vivo study. *Head Face Med* 4:30, 2008.
55. Lagerpusch N: Die Dynamisierung der winkelstabilen Plattenosteosynthese mit Hilfe der "Dynamic Locking Screw" (DLS) - Eine experimentelle Studie an Schafen. 2011.

56. van Gaalen SM, Kruyt MC, Geuze RE, et al: Use of fluorochrome labels in in vivo bone tissue engineering research. *Tissue Eng Part B Rev* 16:209-217.
57. Voelter K: In vivo Studie an Schafen zum Vergleich von Dentalimplantaten in Hinblick auf Oberfläche und Osseointegration. 2007.
58. Biermeier K: Vergleich unterschiedlicher Methoden der Implantatbettpräparation und ihr Einfluss auf die Osseointegration eines Standardzahnimplantates. 2009.
59. von Salis-Soglio M: Früh- und Spätuntersuchung einer neuen Oberflächenbehandlung mit PolyPhosphaten auf Dentalimplantaten- Eine experimentelle Studie an Schafen. 2010.
60. Patterson TE, Kumagai K, Griffith L, et al: Cellular strategies for enhancement of fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1:111-119, 2008.
61. Pearce AI, Richards RG, Milz S, et al: Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 13:1-10, 2007.
62. Chavassieux P, Pastoureau P, Boivin G, et al: Fluoride-induced bone changes in lambs during and after exposure to sodium fluoride. *Osteoporos Int* 2:26-33, 1991.
63. Nunamaker DM: Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*:S56-65, 1998.
64. Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, et al: The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev* 16:123-145.
65. Ravaglioli A, Krajewski A, Celotti GC, et al: Mineral evolution of bone. *Biomaterials* 17:617-622, 1996.
66. Martini L, Fini M, Giavaresi G, et al: Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med* 51:292-299, 2001.
67. Auer JA, Goodship A, Arnoczky S, et al: Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskelet Disord* 8:72, 2007.
68. An YH, Friedman RJF: *Animal Models in Orthopaedic Research*, CRC Press, 1999.
69. Heuberger R: Roughness Measurements on the Groove of Threads of Locking Screws Stardrive® after different Treatments. RMS Report A09\_0432, 2009.
70. Hayes JS, Richards RG: Surfaces to control tissue adhesion for osteosynthesis with metal implants: in vitro and in vivo studies to bring solutions to the patient. *Expert review of medical devices* 7:131-142, 2010.
71. Hayes JS, Khan IM, Archer CW, et al: The role of surface microtopography in the modulation of osteoblast differentiation. *European cells & materials* 20:98-108, 2010.
72. Pearce AI, Pearce SG, Schwieger K, et al: Effect of surface topography on removal of cortical bone screws in a novel sheep model. *J Orthop Res* 26:1377-1383, 2008.
73. Hayes JS, Seidenglanz U, Pearce AI, et al: Surface polishing positively influences ease of plate and screw removal. *Eur Cell Mater* 19:117-126.
74. Steinemann SG: Titanium--the material of choice? *Periodontol* 2000 17:7-21, 1998.
75. Olmstead M., O. P: Report on Long Term Compatibility Testing of New Titanium Alloys. AO Research Grant 1987/88, Stratec Medical, Waldenburg, 1990.

76. Jakobsen SS, Baas J, Jakobsen T, et al: Biomechanical implant fixation of CoCrMo coating inferior to titanium coating in a canine implant model. J Biomed Mater Res A 94:180-186.
77. Johansson CB, Sennerby L, Albrektsson T: A removal torque and histomorphometric study of bone tissue reactions to commercially pure titanium and Vitallium implants. Int J Oral Maxillofac Implants 6:437-441, 1991.
78. Puleo DA, Holleran LA, Doremus RH, et al: Osteoblast responses to orthopedic implant materials in vitro. J Biomed Mater Res 25:711-723, 1991.
79. Leventhal GS: Titanium, a metal for surgery. J Bone Joint Surg Am 33-A:473-474, 1951.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AO/ ASIF	Arbeitsgemeinschaft Osteosynthese – Association for the Study of Internal Fixation
BIC	Bone to implant contact
cm	Zentimeter
CC	Cobalt-Chrom
CCTC	Cobalt-Chrom/ Titan
CCZTC	Cobalt-Chrom/ Zirkonium/ Titan
EKG	Elektrokardiogramm
GPa	Gigapascal
h	Stunde
IE	internationale Einheiten
kV	Kilovolt
LCP	Locking Compression Plate
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMA	Methylmethacrylatlösung
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
Nmm	Newton-Millimeter
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
OP	Operation
S <sub>a</sub>	Average Surface Roughness
sec	Sekunden
TAN	Titan-Aluminium-Niobium
TANNEW	TAN new finish
TANST	TAN Standard
TAV	Titan-Aluminium-Vanadium
µm	Mikrometer
°C	Grad Celsius

## 7 Anhang

### 7.1 Tabellen

Tab. 1 : Gruppenverteilung

Schaf	Position	Schraubentyp	Schaf	Position	Schraubentyp
Schaf 1	1	TANST	Schaf 5	1	STEEL
	2	STEEL		2	CC
	3	CC		3	CCTC
	4	CCTC		4	TANNEW
	5	TANNEW		5	PTST
	6	PTST		6	CCZTC
	7	CCZTC		7	TANST
	8	TANST		8	STEEL
	9	STEEL		9	CC
Schaf 2	1	CC	Schaf 6	1	CCTC
	2	CCTC		2	TANNEW
	3	TANNEW		3	PTST
	4	PTST		4	CCZTC
	5	CCZTC		5	TANST
	6	TANST		6	STEEL
	7	STEEL		7	CC
	8	CC		8	CCTC
	9	CCTC		9	TANNEW
Schaf 3	1	TANNEW	Schaf 7	1	PTST
	2	PTST		2	CCZTC
	3	CCZTC		3	TANST
	4	TANST		4	STEEL
	5	STEEL		5	CC
	6	CC		6	CCTC
	7	CCTC		7	TANNEW
	8	TANNEW		8	PTST
	9	PTST		9	CCZTC
Schaf 4	1	CCZTC			
	2	TANST			
	3	STEEL			
	4	CC			
	5	CCTC			
	6	TANNEW			
	7	PTST			
	8	CCZTC			
	9	TANST			



**Tab. 2: Ergebnisse Torque-Test (Yield Point in Nmm)**

Schraubentyp	Yield Point in Nmm	Std. Dev. ± in Nmm	N
PTST	270.9	87.3	9
TANNEW	259.9	100.1	9
CCZTC	246.6	96.9	9
CCTC	245.6	91.1	8
TANST	234.0	55.8	9
Steel	155.8	83.6	9
CC	130.1	45.8	7

**Tab. 3: Histomorphometrie Gewebefraktionen Gesamt**

Schraubentyp	alte Matrix in %	neue Matrix in %	Granulations- gewebe in %	N
CC	11.2 ± 9.0	41.3 ± 8.2	47.5 ± 13.9	32
CCTC	13.9 ± 12.0	42.2 ± 8.1	43.8 ± 14.0	36
CCZTC	10.6 ± 8.0	43.7 ± 9.9	45.7 ± 12.4	30
PTST	11.7 ± 10.0	42.4 ± 10.0	45.9 ± 11.2	32
Steel	12.0 ± 10.0	43.9 ± 11.1	44.1 ± 13.2	30
TANNEW	11.5 ± 8.5	44.7 ± 11.3	43.8 ± 12.2	30
TANST	11.2 ± 9.1	43.7 ± 7.6	45.1 ± 10.2	36

**Tab. 4 : Histomorphometrie Gewebefraktionen implantatnah**

Schraubentyp	alte Matrix in %	neue Matrix in %	Granulations- gewebe in %	N
CC	4.5 ± 3.8	38.6 ± 7.1	56.9 ± 8.8	16
CCTC	7.0 ± 6.8	42.8 ± 9.9	50.2 ± 13.5	18
CCZTC	5.8 ± 4.1	44.6 ± 10.5	49.6 ± 12.3	15
PTST	5.2 ± 5.5	45.2 ± 8.8	49.5 ± 11.1	16
Steel	6.0 ± 5.5	45.5 ± 12.5	48.6 ± 15.1	15
TANNEW	6.6 ± 6.0	47.8 ± 11.5	45.6 ± 11.2	15
TANST	4.7 ± 4.5	46.2 ± 8.1	49.2 ± 9.1	18

**Tab. 5 : Histomorphometrie Gewebefraktionen *implantatfern***

Schraubentyp	alte Matrix in %	neue Matrix in %	Granulations- gewebe in %	N
CC	17.9 ± 7.5	43.9 ± 8.5	38.2 ± 11.7	16
CCTC	20.9 ± 12.1	41.7 ± 6.1	37.4 ± 11.7	18
CCZTC	15.5 ± 8.0	42.7 ± 9.6	41.8 ± 11.6	15
PTST	18.2 ± 9.4	39.5 ± 10.6	42.3 ± 10.3	16
Steel	18.0 ± 9.9	42.4 ± 9.6	39.6 ± 9.6	15
TANNEW	16.3 ± 7.9	41.7 ± 10.6	42.0 ± 13.2	15
TANST	17.7 ± 7.8	41.3 ± 6.3	41.0 ± 9.7	18

**Tab. 6 : Ergebnisse BIC (Bone-to-Implant-Contact)**

Schraubentyp	BIC in %	± in %	N
CCZTC	39.1	22.4	163
TANNEW	38.0	23.5	194
PTST	36.5	23.5	196
TANST	34.8	22.0	193
CCTC	33.6	23.1	195
Steel	23.2	18.8	178
CC	14.0	13.6	171

## 7.2 Abbildungen



Abb. 1: OP Lagerung

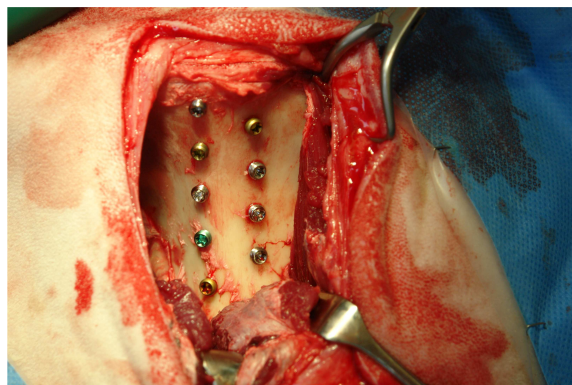


Abb.2: Implantatpositionen 1-9



Abb. 3: Stahlschraube



Abb. 4: Cobalt-Chromschraube



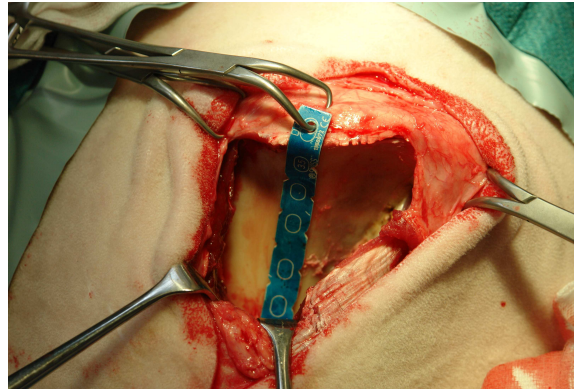
Abb.5: Reintitanschraube



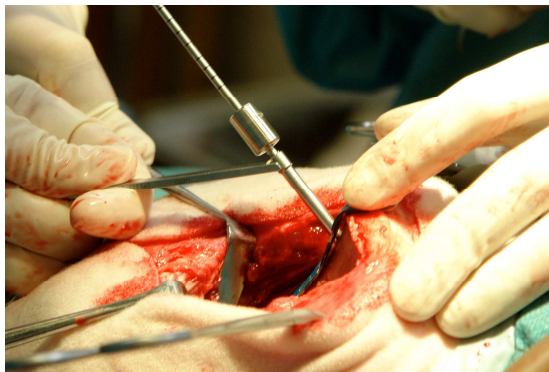
Abb. 6: TAN Standardschraube



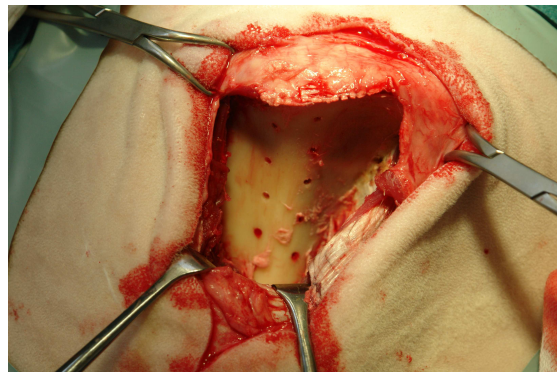
**Abb. 7: TAN new finish Schraube**



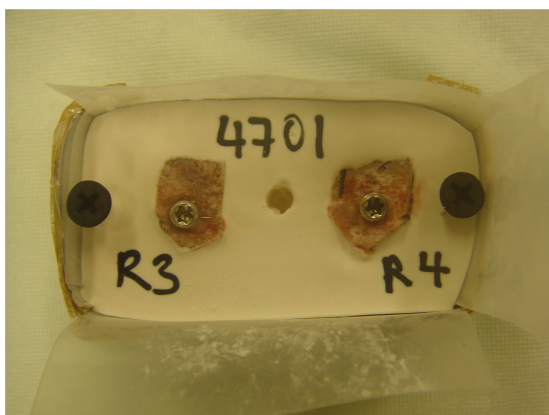
**Abb. 8: Bohrschablone**



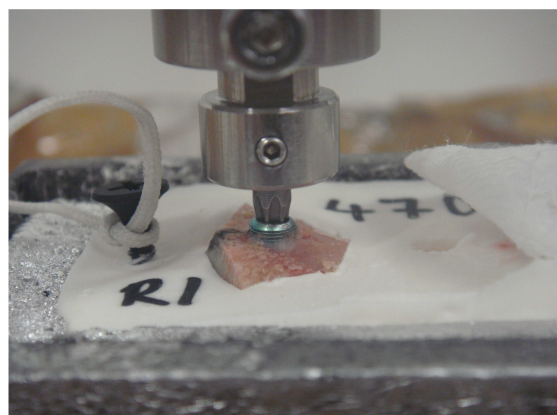
**Abb. 9: Bohren der Implantatlöcher**



**Abb. 10: Bohrlöcher für Implantate**

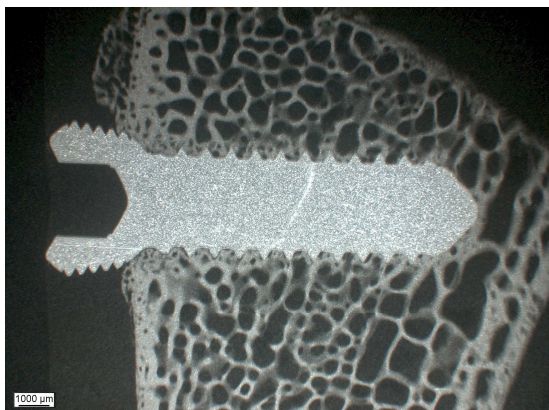


**Abb.11: Gipsblöcke für Torque-Test**

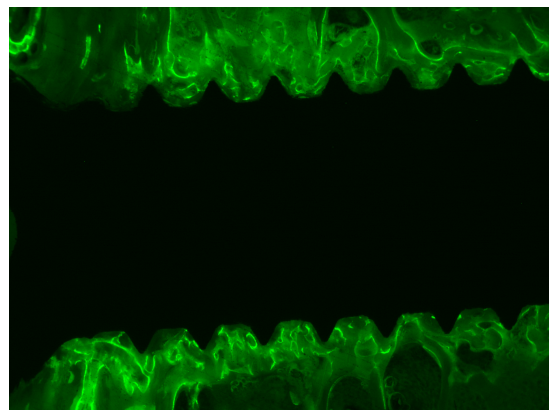


**Abb.12: Torque-Removal-Test**

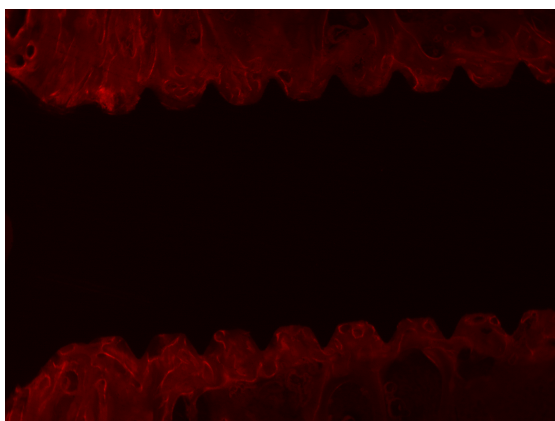




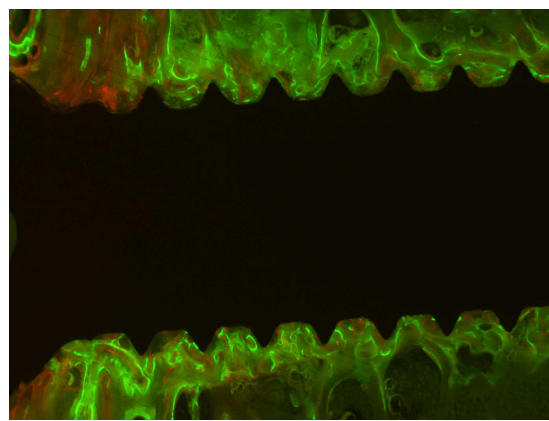
**Abb.13: Mikroradiographie**



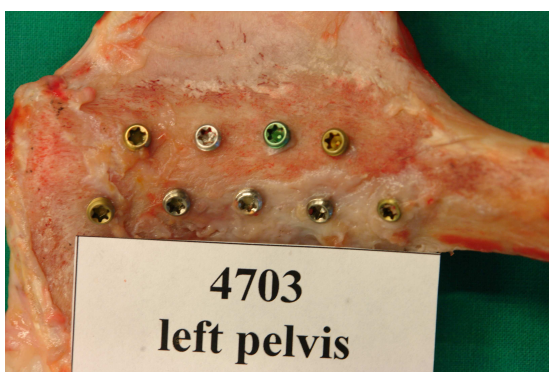
**Abb. 14: Fluoreszenzmarkierung mit Calceingrün – 4 Wochen post OP (Schraubenkopf)**



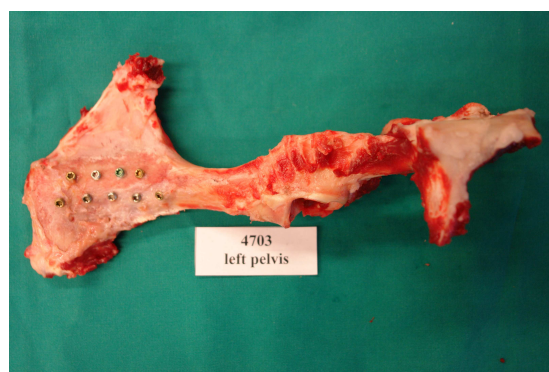
**Abb. 15: Fluoreszenzmarkierung mit Xylenolorange – 8 Wochen post OP (Schraubenkopf)**



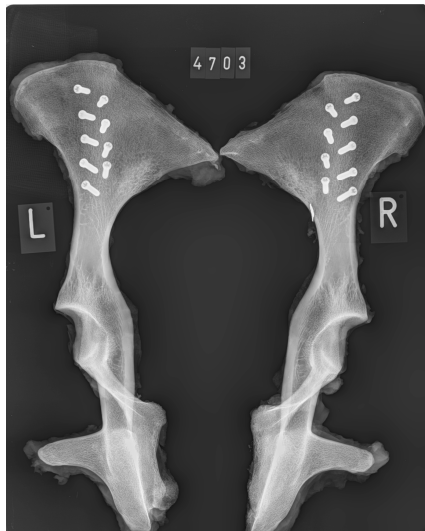
**Abb. 16: Fluoreszenzmarkierung mit Calceingrün + Xylenolorange – 8 Wochen post OP (Schraubenkopf)**



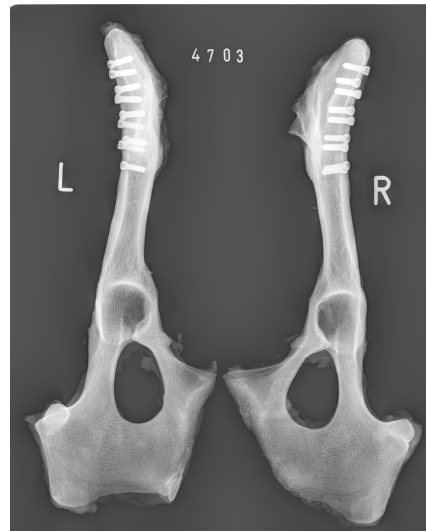
**Abb.17: Detailaufnahme Beckenknochen post mortem**



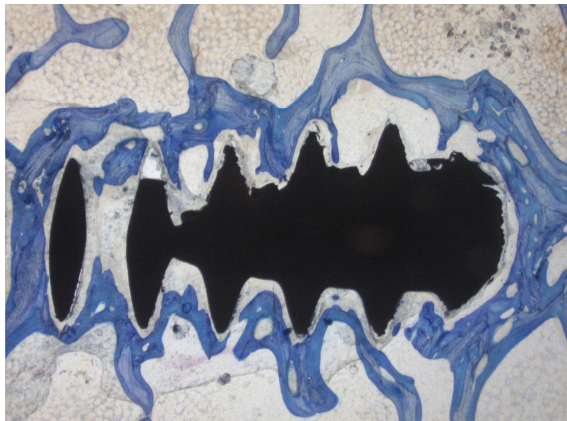
**Abb.18: Übersichtsaufnahme Beckenknochen post mortem**



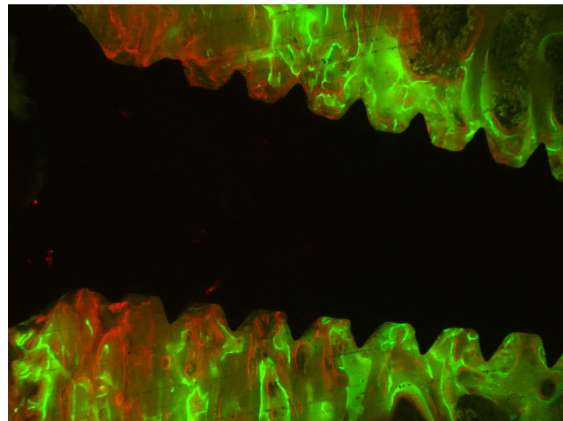
**Abb.19: dorsoventrale Röntgenaufnahme post mortem**



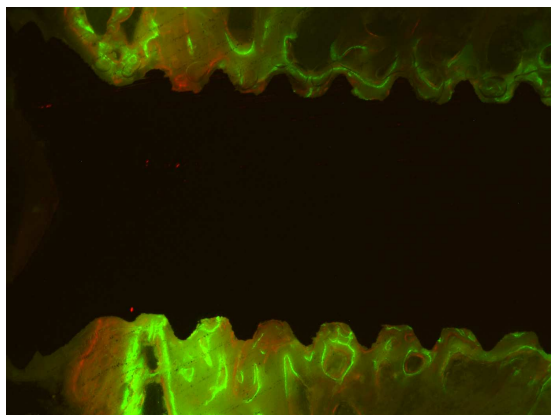
**Abb.20: laterolaterale Röntgenaufnahme post mortem**



**Abb.21: Problemfall Längsschnitt Schraube**



**Abb. 22: TANST Schraube mit erhöhtem Xylenolanteil und deutlicher Strukturierung zwischen den Gewindezähnen**



**Abb. 23: CC Schraube mit geringerem Fluoreszenz-Kontaktanteil zwischen den Gewindezähnen**



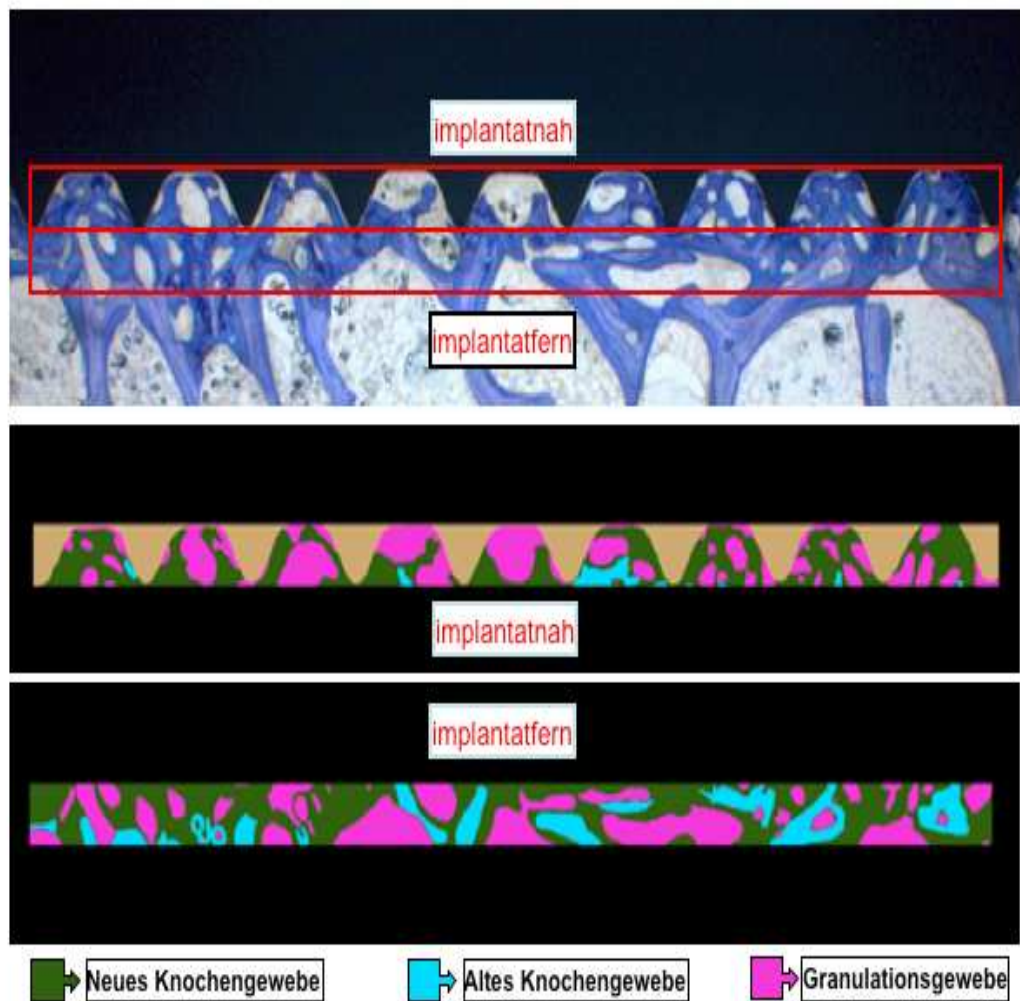


Abb.24: Auswertungsverfahren der Histomorphometrie

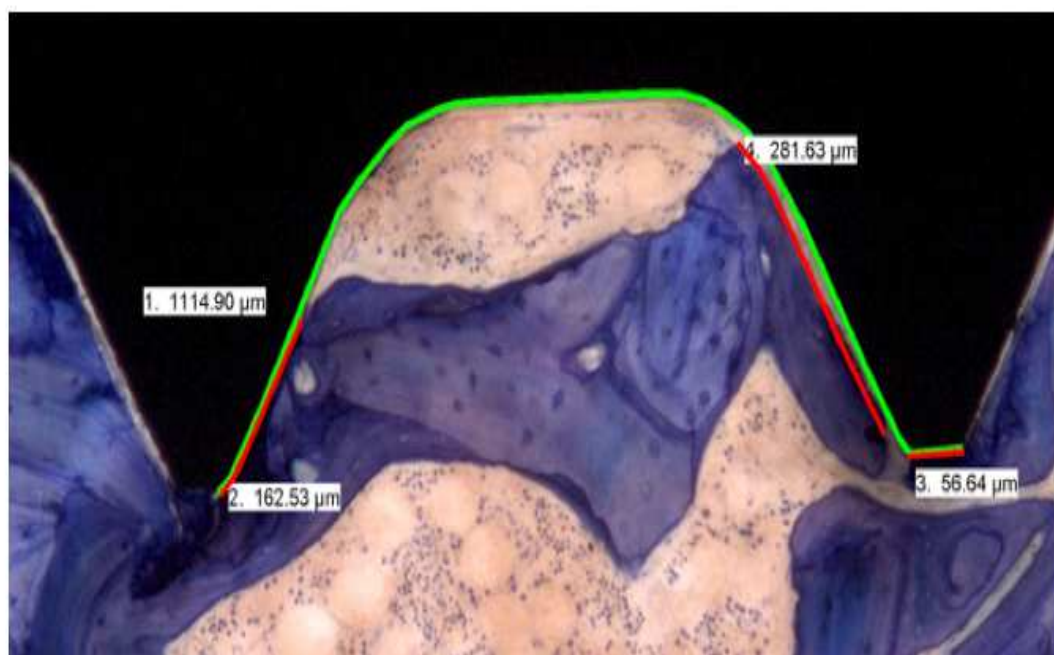


Abb.25: Auswertungsverfahren des BIC (Bone to implant contact)  
Grün: Vermessungslinie Implantat; Rot: Kontaktlinien Knochen zum Implantat

## Danksagung

Von ganzem Herzen danke ich **Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg** für die Überlassung des Themas, ihre grossartige fachliche und menschliche Unterstützung in jeder Hinsicht, sowie ihrer stets loyalen und offenen Einstellung gegenüber allen ihren Mitarbeitern.

Herrn **Prof. Dr. Jörg Auer**, ehemaliger Direktor, sowie Herrn **Prof. Dr. Anton Fürst**, jetziger Direktor der Pferdeklunik der Vetsuisse-Fakultät danke ich für die freundliche Unterstützung der MSRU.

**Prof Dr. Ulrich Stöckle**, Direktor der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik, Tübingen, für die Übernahme des Korreferats.

Bei **Rudolf Koch** und **Daniel Andermatt**, den Projektpartnern von Synthes GmbH, sowie bei unseren Kooperationspartnern vom Klinikum rechts der Isar in München, **Prof. Dr. Ulrich Stöckle** und **Dr. Stefan Döbele** möchte ich mich ganz herzlich für die Ermöglichung des Projekts, sowie für die sehr gute und äusserst angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Die Operationen wären ohne **Kisi** und **Michi** nicht möglich gewesen. Vielen Dank für Eure umgängliche Art und die reibungslose Zusammenarbeit. Auch die Fahrer **Alois**, **Markus K.**, **Markus A.** und **Philipp** haben uns unterstützt. Ebenso möchte ich mich bei **Bruno Gerzner** und **Paul Müller** für ihre Geduld mit uns bei einer doch schweren Aufgabe bedanken.

Für die hervorragende Anfertigung der vielen histologischen Schnitte danke ich **Kati Zlinsky** und **Sabina Wunderlin** und **Monika Hilbe**.

Ein besonderer Dank gilt auch **Käthi Kämpf** für ihre Unterstützung bei allen Fragen im Labor und darüber hinaus und für ihre angenehme Art.

Herzlicher Dank geht an **Karina Klein** und **Michele Sidler** für ihre stetige Einsatzbereitschaft in jeglicher Hinsicht.

---



Dank gebührt auch der **Familie Knüsel** für die hervorragende Betreuung der Schafe sowie für die herzliche Aufnahme auf ihrem Staffeleggghof. Für die Betreuung der Tiere am Tierspital möchte ich mich vor allem bei **Silvana Resegatti** sowie bei den **Pflegern des Tierspitals** bedanken.

**Alexander Bürki** vom ARTORG Center in Bern danke ich für die Durchführung der biomechanischen Testung der Implanate.

Auch bei **Hannes Knubben** möchte ich mich ganz herzlich für die Unterstützung bei der Auswertung der histologischen Schnitte bedanken.

Für die vielen Anästhesien, seine humorvolle Art und den doch oft auch kurzfristigen Einsatz für meine berufliche Zukunft bedanke ich mich bei **Peter Kronen**.

**Rainer Egle** und **Gaby Schmid** danke ich für die tolle Unterstützung im Hintergrund.

Ein grosses Dankeschön geht an das gesamte Team der MSRU: **Katja Nuss, Sabine Koch, Karina Klein, Stefan Stübinger, Michèle Sidler, Nico Lagerpusch, Philipp Conze, Nathalie Fouché, Sabrina Ernst, Tetyda Dobak, Ingmar Meth, Isa Mosch, Francis Pusch, Maren Lesser, Andrea Wolk, Marcella von Salis, Sven Nielsen** sowie **Anja** und **Martin Waselau**. Ich hatte eine tolle und unvergessliche Zeit in der MSRU.

Herzlicher Dank geht an **Maren** und **Nico** für ihre Kollegialität, ihre ehrliche Art und ihre Freundschaft.

Meinem Freund **Hannes Bürge** danke ich für seine Liebe, dass er mich so akzeptiert wie ich bin und mit meinen Launen jederzeit humorvoll umzugehen weiss.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine **Freunde** und **meine Familie**, an meine Schwestern **Anne** und **Kathy**, und vor allem an meine Eltern **Hartmut** und **Cornelia Sievert**. Ohne ihre Unterstützung und ihre Liebe wäre ich heute nicht dort wo ich bin.

Tiefsten Dank schulde ich den Schafe, die für die Forschung ihr Leben liessen.

---

## Lebenslauf

Name	Christine Sievert
Geburtsdatum	26.12.1982
Geburtsort	Köln
Nationalität	Deutsch
1989-1993	Johann-Bruecker-Grundschule Schönaich, (D)
08/1993 – 06/2002	Max-Planck-Gymnasium, Böblingen, (D)
18.06.2002	Abschluss Allgemeine Hochschulreife
10/2003-01/2009	Studium der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig, (D)
04.03.2009	Erhalt der Approbation
03/2009-10/2010	Mitarbeit und Anfertigung der Dissertation in der Musculoskeletal Research Unit, Departement für Pferde der Vetsuisse Fakultät der Universität Zürich unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst
Seit 01/2011	Mitarbeiter in Bessy's Kleintierklinik Regensdorf (CH)

---